

THESIS

MUNICH

1965

Über die Wirkung von Prednisolon
(Dehydro-Hydrocortison)
auf das Poliomyelitis-Virus Typ I

Wilhelm Bornschein



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. A. Wiskott

Über die Wirkung von Prednisolon (Dehydro-Hydrocortison)
auf das Poliomyelitis-Virus Typ I

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wilhelm  Bornschein
aus

München

1965

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Dozent Dr. O. Goetz

Mitberichterstatter: Professor Dr. A. Wiskott

Dekan: Professor Dr. O. Hug

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 6. 1965

Herrn Privatdozent Dr. O. Goetz danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, die Übernahme des Referates, sowie für wertvolle Ratschläge, und Unterstützung bei der Arbeit.

Frl. H. Nickel und Frl. K. Oettrich gilt mein Dank für ihre Bemühungen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Allgemeiner Teil	1
B. Material und Methoden	11
C. Versuche und Ergebnisse	17
D. Diskussion	32
E. Zusammenfassung	39
F. Literaturverzeichnis	40

A. Allgemeiner Teil

Cortison und Hydrocortison beeinflussen Virusinfektionen in vielen Fällen ungünstig. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre am Menschen (16, 18, 29, 43, 66, 74, 82) und an Laboratoriumstieren (44, 49, 54, 80, 84, 85, 86, 88) kamen zu diesem Ergebnis. Die Behandlung der Tiere mit Steroiden führt oft zu einer Verstärkung der Krankheitssymptome und zu früherem Tod (80). In einigen Fällen ging sowohl beim Menschen, als auch bei den Tieren ein milder Krankheitsverlauf oder eine völlig bland verlaufende Virusinfektion in einen gravierenden Verlauf über (16, 18, 29, 43, 53, 66, 80, 82, 88).

Nach E.H. Kass und M. Finland können Cortison und Hydrocortison eine Virusinfektion verschiedenartig verstärken:

- I. Direkter Effekt auf das Virus.
- II. Vermehrte Virusproduktion.
- III. Verhinderte Antikörperbildung.
- IV. Verhinderung entzündlicher oder regenerativer Reaktionen.
- V. Andere Möglichkeiten einer Beeinflussung von Virusinfektionen.

Nach Kilbourne (49) hat ein Gemisch von extrazellulärem Virus und Hydrocortison keinen direkten Einfluss auf das Virus. Erichsen (20) dagegen konnte durch Titration der infektiösen Teilchen in den Chorioallantois-Membranen bebrüteter Hühnereier zeigen, dass Cortison in Dosen von 0.1 mg über 72 Std. das Wachstum des Kuhpockenvirus verhindert.

In in-vivo-Experimenten wurde gezeigt, dass besonders foudroyante Krankheitsverläufe bei Virusinfektionen nach Cortison und Hydrocortisongaben mit verstärkter Virusproduktion einhergehen, in anderen Fällen aber sah man wiederum keinen derartigen Effekt (45, 46, 53, 80, 85). De Maeyer E. und de Maeyer J. bewiesen im in-vitro-Versuch, indem sie DE7R-Ratten-Tumor-Zellen mit Sindbis-Virus und einem Sindbis-Virus-Cortisol-Gemisch infizierten, dass, am CPE gemessen, Cortisol hier keinen Einfluss auf eine vermehrte Virusproduktion besitzt (14). In Studien über die Zunahme des Dickenwachstums infizierter Chorioallantois-Membranen fand Erichsen in mit Cortison behandelten Eiern ein deutlich dünneres Ektoderm. Ausserdem waren die mit Cortison behandelten Eier sehr viel weniger hämorrhagisch als die Kontrolleier. Der Verfasser interpretiert die Ergebnisse als Beweis für die

Verhinderung der Kuhpockenvermehrung in Cortison behandelten Eiern (19). Kilbourne (52) fand dagegen, ebenso wie Wasielewski und Mitarbeiter (94), dass im Brutei, nach Cortisongabe, die Virusaussaat bei einer Infektion mit Influenza B-Lee-Virus gesteigert war. Eine statistisch gesicherte Vermehrung war allerdings erst bei hohen Cortisongaben (150 mg/kg Kgw.) nachweisbar.

Eine deutliche Wirkung von Cortison auf die Antikörperbildung ist zumindest in klinischen Dosen nicht nachzuweisen (44, 81); durch grosse Dosen von NNR-Steroiden konnte aber mit quantitativen, immunochemischen Methoden gezeigt werden, dass bei Hasen, Ratten und Mäusen die Antikörperbildung gehemmt wird (46, 48, 49). Es ist anzunehmen, dass dies vorwiegend die primär gebildeten Antikörper sind (4, 93). So waren, wie verschiedene Autoren (4) berichten, unter Cortisoneinfluss und intravenösen Antigengaben von Rinderserumalbumin und Human-Gamma-Globulin bei Kaninchen, die Haemagglutinine eingeschränkt, die Praecipitine total unterdrückt. Die sekundäre Antikörperbildung (Reinjektion von Antigen nach Sensibilisierung) wird durch Cortison dagegen nicht verhindert (4).

Bereits gebildete Antikörper sinken unter Cortisongaben etwas ab, doch geht das so langsam vor sich, dass die plötzlichen Änderungen klinisch milder Krankheitsverläufe in bedrohliche Zustände damit nicht erklärt werden können (44).

Kilbourne fand, dass sich ein destruktiver Effekt des Cortison bei Virusinfektionen am Organismus bereits vor der Antikörperbildung nachweisen lässt. Ein zerstörerischer Effekt des Cortison bei Virusinfektionen zeigte sich auch an befruchteten Eiern, in denen mit Sicherheit keine Antikörperbildung stattfindet (48, 49, 54).

Ein bekannter Effekt des Cortison ist die Dämpfung oder Verhinderung entzündlicher und regenerativer Gewebsreaktionen. In einer Arbeit über Steroidhormonanalysen im Plasma und im Harn, die vor und im Ablauf von Infektionskrankheiten durchgeführt wurden, konnten Zimmermann und Brühl (101) einen Zusammenhang zwischen anabolen und katabolen Hormonen und einer Förderung bzw. Hemmung der mesenchymalen Abwehrkraft beweisen. Ein Regelkreis Hypophysenhormone-Nebennierenrindenhormone-Mesenchym wurde diskutiert. Es ist nach den Forschungsergebnissen der letzten Jahre sehr wahrscheinlich geworden, dass Cortison auch in den Zellstoffwechsel

eingreift. Kilbourne (52) und Wasielewski (94) untersuchten den Einfluss von Cortison auf die Proteinsynthese des Hühnerembryos. Es fand sich dabei eine Hemmwirkung des Cortison auf den Eiweissaufbau und die Zellvermehrung. Grossfeld konnte zeigen, dass Cortison Zellwachstum und Zellteilung in der Gewebekultur vermindert (27). Nowell erzielte nach Prednisolongaben, die in therapeutischen Breiten lagen, eine Hemmung der Mitoserate bei Leukozyten um 50% (67). Respiration und Glykolyse der Zellgewebe werden verändert (21, 26). Nach E.H. Kass und M.J. Kendrick vermindert Cortison die Pentose-Nukleinsäure-Konzentration in nicht stimulierten Lymphknoten (45).

Für in-vitro-Experimente an der Zellkultur ist die Frage nach einer eventuellen zelltoxischen Wirkung des Cortison und des Hydrocortison von grosser Bedeutung. J.S. Wellington und H.D. Moon zeigten, dass Hydrocortison in einer Konzentration von 100-200 Gamma/ml innerhalb von 48 Std. nur sehr geringgradig das Wachstum menschlicher Leberzellen hemmt. Die Eiweissvermehrung der ganzen, mit Cortison versetzten Zellkultur, gemessen am Stickstoffgehalt, ging nach 72 Std. etwas zurück, der Stickstoffgehalt der Einzelzelle nahm dagegen etwas zu. Es bestand keine Proportionalität zu den Cortisonkonzentrationen. Die Zahl der jeweils bestimmten nuclei nahm bei steigender Cortisonzugabe konstant ab. Die Autoren bestimmten daraus eine zunehmende Plasma-Kern-Proportion bei steigender Cortisonkonzentration (96). Über einen cytotoxischen und wachstumshemmenden Effekt der NNR-Hormone auf verschiedene Zellstämme nach etwa 3 Tagen oder nach Cortisondosen von 1000 Gamma/ml berichteten Rivera und Mitarbeiter (76), Holden M. und Adams L.B. (36), Grossfeld H. und Ragan C. (27), sowie Lenti G., Tortarolo E., Musolino G. und Tappero T. (59).

Weitere Autoren fanden Hydrocortison als das am wenigsten toxische Wirkung entfaltende Steroid unter sieben getesteten Stoffen dieser Reihe (1). In Dosen von 10 Gamma/ml zeigte sich sogar eine Art konservierende Wirkung des Cortison: Helazellen blieben konstant 21 Tage, ohne Fütterung in ausgezeichnetem Zustand (1, 56, 97), während die übliche, in Hela-Zellkulturen sonst rasch eintretende Degeneration verzögert und gehemmt wurde (97).

An Mamma-Adeno-Carcinomzellen der Maus wurden jüngst nach Cortisolzugabe zum synthetischen Medium 199 aussergewöhnlich viele Einschlusskörperchen entdeckt, die elektronenmikroskopisch als virusähnliche Partikel erkannt wurden. In den Medium-199-Kontrollen tauchten ebenfalls solche Partikel auf, wenn auch nicht in gleicher Anzahl. In nicht in der Kultur gezüchtetem

Gewebe konnten keine Einschlusskörper gefunden werden. Welche Rolle hier das Cortison und das synthetische Medium spielen, konnte noch nicht geklärt werden (76).

Nach der einleitend angeführten Einteilung über die mögliche Beeinflussung einer Virusinfektion durch Cortison und Hydrocortison, könnte unter dem Punkt V auch das in den letzten Jahren erforschte Interferon eine Bedeutung besitzen. Es wurde nach grundlegenden Arbeiten von Luria und Delbrück (61) von Isaacs, Burke und Lindenmann 1957 entdeckt und als nicht sedimentierbares Produkt, durch Wechselwirkung inaktivierter Influenza-Viren mit lebenden Zellen entstanden, bezeichnet. Wenn es auf normale Hühner-Embryozellen gebracht wird, macht es diese gegenüber Infektionen mit Myxo und Vaccine-Viren resistent (41). Zahlreiche Autoren fanden bis heute Interferonwirkung auf die verschiedensten Viren. Ebenso wurde das Interferon durch die verschiedensten Viren auf ebenso vielfältigen Zellkulturen sowie Chorio-Allantois-Membranen gewonnen (38), wobei vor allem Enders und Ho (35) mit Polio-Viren arbeiteten (2, 8, 35, 41, 60, 69, 71, 79). Die Wirksamkeit des Interferon hängt einerseits von der Art und dem Titer des Interferon bildenden Virus, andererseits von der Tatsache ab, ob dieses Virus noch aktiv, oder schon durch Erhitzen bzw. UV-Bestrahlung inaktiviert ist; die verschiedenen Forscher arbeiten teils mit aktiven, teils mit inaktivierten Viren (2, 7, 8, 35, 38, 39, 41, 60, 64, 69, 71, 72). Schliesslich hängt die Wirksamkeit des Interferon von Art und Titer des interferierenden, aktiven Virus ab (6, 39, 92). Eine weitere entscheidende Rolle spielt die Art der Gewebekultur oder der Chorio-Allantois-Membran, auf der das Interferon gewonnen wird. Bis vor Kurzem galt es geradezu als Kriterium für das Interferon, dass es nicht auf Hela-Zellen zu gewinnen sei (72). Nachdem es aber Ho und Enders (35), Cantell (6) und Cantell und Paucker (7) erstmals gelang, auf Hela-Zellen Interferon zu gewinnen, wurde dies auch in dieser Arbeit mit dem inaktivierten Poliomyelitisvirus Typ I versucht.

Über das Wesen des Interferon wurde in den letzten Jahren viel gearbeitet. Das Interferon unterscheidet sich in seiner Antigenstruktur völlig vom Virus und stellt nur ein sehr gering wirksames Antigen dar (38). Es ist auch im Gegensatz zu allen Antikörpern nicht antigenspezifisch wirksam, es ist nicht organspezifisch und nur bis zu einem gewissen Prozentsatz artspezifisch wirksam, denn Polikoff und Mitarbeiter konnten zeigen, dass durch einen optimalen Titer des interferierenden Virus, Interferon auch in heterologen

Zellsystemen eine gewisse Aktivität entfaltet (73).

Durch physikochemische Analysen konnte gezeigt werden, dass es sich beim Interferon um einen Eiweisskörper mit relativ grosser Hitze und pH-Stabilität, ohne Nukleinsäurekomponente, mit einem Molekulargewicht von 13000 bis 25000 handeln muss (58, 92).

Über den Mechanismus der Interferonbildung ist nur bekannt, dass die Virusnukleinsäuren wohl den wesentlichen Anstoss zur Interferonbildung darstellen (38, 70). Ob das Interferon letztlich vom Virus oder von der Zelle stammt ist noch nicht entschieden (92). Aus seiner Wirkungsweise, teils als Antigen, teils als Antikörper, lässt sich das kaum entscheiden. So meint Wagner, dass das Interferon an sich nicht von den Viruspartikeln des bildenden Virus abstammt, da das Interferon von Influenzaviren durch Hitzelabilität differenziert werden kann und Hühnererythrozyten nicht adsorbiert (92). Andererseits aber gelang es Paucker und Cantell in Meerschweinchen interferonspezifische, neutralisierende Antikörper zu bilden (68). Nach einer modernen Theorie, die experimentell recht gut gestützt ist, steht die Interferonproduktion unter der Kontrolle der DNS-abhängigen RNS-Synthese (102). Das würde bedeuten, dass die genetische Information für die Produktion von Interferon normalerweise bereits in der Zelle enthalten ist und dass die Virusinfektion einen Mechanismus auslösen könnte, der physiologisch von der Zelle selbst unterdrückt wird.

Über die Wirkungsweise des Interferon gibt es auch nur eine Reihe von Theorien. Bewiesen ist bisher nur, dass das Interferon die Synthese und Reduplikation der RNS verhindert (15, 28, 34). Isaacs und Mitarbeiter konnten daneben auch eine dem Dinitriphenol ähnliche Wirkung des Interferon finden und schliessen auf eine entkoppelnde Eigenschaft dieser Substanz (40). Sehr wahrscheinlich ist auch hier, dass das Interferon in die Zellgenetik eingreift. Versuche von Levy und Baron mit Actinomycin D und Interferon an der Fibroblasten-Zellkultur mittels H^3 -Uridin-Markierung (102) lassen vermuten, dass die nicht DNS-abhängige RNS-Synthese Angriffspunkt für die Interferonwirkung darstellt. Es wäre denkbar, dass das Interferon auf die Energieversorgung dieser RNS-Synthese wirkt oder eine Polymerase oder ein anderes für die RNS-Synthese notwendiges Enzym hemmt (38, 102). Nach den Phagenexperimenten von Burton und Stent würde das Interferon, als Protein, das Informationsmuster für die Reproduktion der in die Zelle eindringenden Virus-RNS enthalten und somit eine Entgleisung der Virusproduktion bewirken (zit. nach 39).

Nachdem Tyrell, Tamm u.a., Substanzen fanden, die in der Lage waren die Virusinterferenz zu hemmen (91), wurden solche Substanzen auch auf eine Wirkung gegenüber dem Interferon untersucht. Über einen Einfluss von Cortison auf die Interferonbildung wurde erstmals von Kilbourne berichtet (52, 55). Er gab 2 Stunden vor der Interferonproduktion mit Influenza-Virus, Cortisol in Dosen von 0.1-1.0 mg auf Hühnerchorioallantoismembranen, in denen er das Interferon gewann. Kilbourne wies durch Reduktion des Hämagglutinin-titers eine hemmende Wirkung des Cortisol auf die Interferonsynthese an der Chorioallantoismembran nach (55). In anderen Experimenten beschrieb Kilbourne auch einen hemmenden Einfluss von Cortison auf die Wirksamkeit bereits gebildeten Interferons in vitro, wenn es 2 Stunden vor der Inokulation des Interferons gegeben wurde und vor der Interferon-Inkubation der Chorioallantois-Membranen wieder durch Waschen entfernt wurde (55). De Maeyer E. und de Maeyer J. beschrieben ebenfalls einen doppelten Effekt des Cortison auf das Interferon. An Rattentumor-Zellkulturen wurde mit aktivem Sindbisvirus und Cortisolzugaben von 0.025 und 0.25 Gamma/ml Interferon gebildet. Wie Kilbourne konnten auch diese beiden Autoren einen deutlichen Hemmeffekt des Cortisol auf die Interferonsynthese nachweisen. Neben dieser Untersuchung über den Einfluss des Cortisol auf die Interferonbildung wurde auch der Effekt des Steroides auf die Interferonwirkung studiert. Nach Dialyse gegen Soerensen-Puffer (pH 2), zur Inaktivierung der für die Interferonbildung verwendeten Viren und zur Entfernung des primär zugesetzten Cortisol, wurde erneut Nebennierenrindenhormon zugesetzt und sein Einfluss auf die Wirkung des Interferon an der Rattenembryo-Zellkultur mit Hilfe der "Plaque-forming"-Methode studiert. Durch Gegenüberstellung der Interferon-Präparate und der Interferon-Präparate denen das Hormon zugesetzt worden war, zeigte sich im Gegensatz zu den Experimenten Kilbournes ein die Wirkung des Interferon verstärkender Effekt des Cortisol (12). Am Brutei und mit Influenza Viren, untersuchten v. Wasielowski, Thiele und Stauter das Wesen des Cortison-Eingriffes bei Virusinfektionen, unter besonderer Berücksichtigung von Interferenzmechanismen. Wie Kilbourne fanden diese Autoren eine Mehrproduktion von Influenza-virus unter Cortison, verneinen aber die Verhinderung der Interferonbildung als Ursache (94).

Nach Abwägen der erwähnten möglichen Einflüsse von Cortison auf das Virus, die Virusvermehrung und auf das Interferon, sowie nach Aufsuchen einer Methode, die Untersuchungen an der Zellkultur in einem möglichst breiten Rahmen

zulässt und Raum gibt für differenzierende Aussagen, ergaben sich für diese Arbeit folgende Problemstellungen:

- I. Inwieweit beeinflusst Dehydro-Hydrocortison die Adsorption und intrazelluläre Vermehrung von Poliomyelitisvirus Typ I in der Helazelle?
- II. Inwieweit beeinflusst Dehydro-Hydrocortison in vitro die Neutralisation von Poliomyelitisvirus Typ I durch Humanantikörper?
- III. Welchen quantitativen Einfluss besitzt Dehydro-Hydrocortison auf die Interferon-Bildung?

Die Arbeitsmethode, die in der Virologie differenzierende Aussagen zulässt, wurde in der Methode der indirekten Immunfluoreszenz gesehen.

Die Methode der Immunfluoreszenz besitzt 3 wesentliche Vorzüge:

1. Sie erlaubt den Syntheseprozess des Virus in der Zelle sichtbar zu machen.
2. Sie erlaubt eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen infizierten Zelle von der nicht infizierten Zelle.
3. Sie lässt eine zeitliche Erfassung der einzelnen Stadien der intrazellulären Virusvermehrung zu.

Aus den genannten Gründen ist die Methode der Immunfluoreszenz gerade für eine Untersuchung über den Einfluss eines Medikamentes auf das Virus geeignet, gestattet sie doch einen Einblick in den Ablauf der Infektion.

Nach Hinuma und Hummeler (33) wurden 3 Phasen im Verlauf der intrazellulären Virusvermehrung durch Fluoreszenzmarkierung unterschieden: Stadium I: Einzelne, perinukleäre Fluoreszenzgranula, geringe Antigenbildung. Stadium II: Kräftige Fluoreszenzgranula im Cytoplasma, die anzeigen, dass bereits mehr Antigen gebildet wurde. Stadium III: Brillante Fluoreszenz in der ganzen Zelle, die bedeutet, dass die Zelle mit einer soliden Antigenmasse ganz ausgefüllt ist.

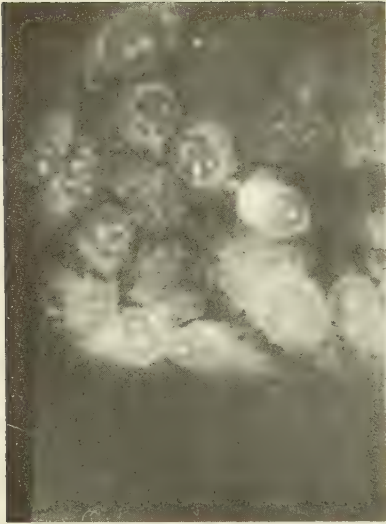


Abb. 1 In der oberen Hälfte des Bildes nicht infizierte Zellen. In der untersten Zellreihe geringgradige, perinukleäre Fluoreszenz. Antigenbildung dem Stadium 1 entsprechend.



Abb. 2 Oben drei Zellen mit kräftiger Fluoreszenz des Cytoplasma. Deutliche Antigenbildung vom Stadium 2. Darunter eine Zelle mit brillanter Fluoreszenz der ganzen Zelle. Antigenbildung vom Stadium 3.

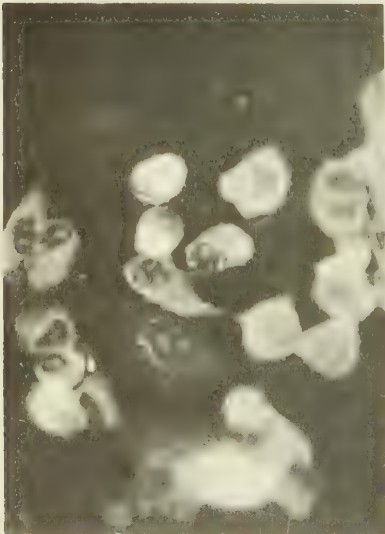


Abb. 3

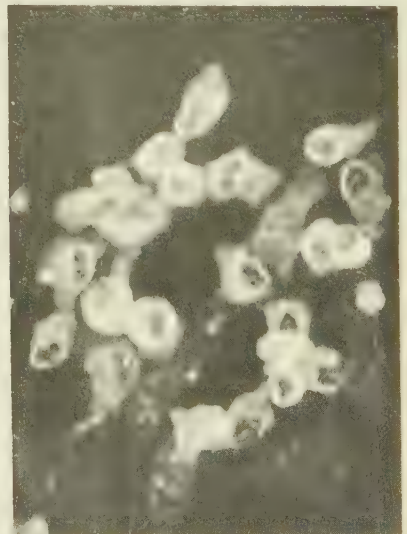


Abb. 4

Abb. 3 und Abb. 4 zeigen Ausschnitte aus einer mit Poliomyelitisvirus infizierten Hela-Zellschicht, wie sie sich nach Immunfluoreszenzfärbung bei der mikroskopischen Betrachtung ergeben.

Über die Geschichte und auf das Wesen der Immunfluoreszenz sei hier kurz eingegangen:

A.H. Coons, Creeck H.J. und Jones R.N. (11) berichteten zum ersten Male 1941 über die Möglichkeit, ein Antikörpermolekül mit einfachen chemischen Verbindungen zu konjugieren, ohne dass dabei seine Fähigkeit verlorengeht spezifisch mit seinem Antigen zu reagieren. - Bindungen aromatischer Isocyanate an Proteine wurden schon 1933 beschrieben und der Mechanismus aufgeklärt: 80-90% der freien Amino-Gruppen des Caseinogens, vor allem die Epsilon-Amino-Gruppen der Lysine binden in leicht alkalischem Medium die freien Phenyl-Gruppen der Isocyanate (100).

Erläuterungen und praktische Hinweise zu dieser Methode gaben 1950

A.H. Coons und M.H. Kaplan (12): Eine Antikörperlösung mit hohem Titer wird mit Fluoreszein-Isocyanat konjugiert. Die sich ergebende fluoreszierende Antikörperlösung wird als spezifisch histochemisches Färbemittel auf Gewebe gegeben. Wo immer sich die Antigen-Antikörper-Praecipitate bilden, wird der Fluoreszein-Antikörper gebunden. Nicht reagierendes und indifferentes Fluoreszein-Protein kann durch einen Waschprozess entfernt werden. Das markierte Gewebe kann nun unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Das brillante, gelb-grüne Licht des fest haftenden fluoreszierenden Proteins zeigt das Vorhandensein und die Lokalisation des homologen Antigens an.

Es gibt zwei Verfahren der Antikörpermarkierung durch die Isocyanat-Farbstoffe. Eine sogenannte direkte Methode, bei der die Antikörper sofort mit dem Farbstoff konjugiert werden, und die so markierten Antikörper mit dem nicht markierten, gesuchten Antigen zu einem unter dem Mikroskop fluoreszierenden Produkt reagieren. Leider hat diese Methode zur Aufklärung eines unbekannten Antigens mit Hilfe eines bekannten Antiserum den grossen Nachteil, dass bereits geringe Spuren nicht konjugierter Antikörper mit dem zu bezeichnenden Antigen nicht markierte Proteinkomplexe eingehen, die ihrerseits mit den konjugierten Antikörpern nicht mehr reagieren (10). So kann eine Färbung mit dieser direkten Methode besonders leicht ein nur wenig brillantes Leuchten und somit keine eindeutige Auswertung ergeben. Es bedeutete eine grosse Vervollkommnung des Verfahrens, als die indirekte Methode der Immunfluoreszenz erstmals angegeben wurde (24, 95).

Hierbei handelt es sich um einen modifizierten Coombstest, in dem die Reaktion eines nicht konjugierten Antikörpers mit seinem Antigen durch eine zweite Reaktion angegeben wird (95). Der nicht konjugierte Antikörper spielt hier eine

doppelte Rolle, er reagiert als Antikörper in der ersten Reaktion, dagegen als Antigen in der zweiten Reaktion. In der zweiten Reaktion geht das nicht konjugierte Reaktionsprodukt, das in der Fraktion der Gammaglobuline enthalten ist, mit einem konjugierten Antigammaglobulin eine Bindung ein. Das verwendete Antigammaglobulin wird hierzu von einem Tier einer anderen Tiergattung gewonnen, das gegen das Gammaglobulin sensibilisiert wurde (10).

Beim Färbeprozess können die überschüssigen oder indifferenten nicht konjugierten Antikörper, die keine Reaktion mit dem Antigen eingingen, sehr gut ausgewaschen werden, bevor das konjugierte Antigammaglobulin zugegeben wird; das nicht reagierende Konjugat wird nach der Inkubation ebenfalls ausgewaschen. Dadurch, ebenso wie durch die Wahl besonders hoher Antikörper und Antigammaglobulintiter, kann eine grosse Reaktionsspezifität erreicht werden (9). Entsprechend ideale Antikörper und Antigammaglobulin-Verdünnungsstufen, die eine optimale Reaktion und ausreichendes Auswaschen ermöglichen, müssen aber vor jeder Arbeit mit neuen Seren erst im Versuch ausgetestet werden.

Eine weitere bislang grosse Schwierigkeit stellte die Trennung des fluoreszein-markierten Antigammaglobulin von freiem, ungebundenem Fluoreszein dar, das die Spezifität der Reaktion sehr beeinträchtigt hat. Die Anwendung von Mäuseleberpulver als Absorbens, von Anionenaustauschern und verschieden modifizierten Dialysemethoden brachten nicht die erhofften Erfolge. Erst seit Einführung der sog. Gelfiltrierung mit Sephadex (74) ist die absolute, auch Kreuzreaktionen weitgehend ausschliessende Spezifität des Immunfluoreszenzverfahrens wie sie Hatch und Mitarbeiter zeigen konnten, wirklich gewährleistet (30). Die Technik beruht auf der Säulenchromatographie. Als stationäre Phase wird ein Dextrangel in Form kleiner Körner, genannt Sephadex verwendet. Die ungeladene, wasserunlösliche Substanz bildet in gequollenem Zustand ein dreidimensionales Maschenwerk bestimmter Maschengrösse. Der Vernetzungsgrad ist genau definiert und somit auch eine Molekulargewichtsbeziehung gegeben. Bei der Filtration können nun Substanzen, die ein bestimmtes Molekulargewicht besitzen, in diesem Fall die markierten Proteine, gerade nicht in das Maschenwerk der Gelkörner eindringen. Sie wandern also an den Maschen vorbei und verlassen die Säule zuerst. Substanzen mit einem Molekulargewicht unterhalb der definierten Grenze, in diesem Fall die freien, ungebundenen Isothiocyanate, können durch das Netzwerk diffundieren und werden deshalb beim Wandern durch die Säule verzögert (nicht zurückgehalten). Wichtig ist bei diesem Verfahren das rechtzeitige Unterbrechen der Filtrierung, d.h.

zu einem Zeitpunkt, zu dem die zweite Phase die Säule noch nicht passiert hat.

T. Tokumaru konnte quantitativ mit Hilfe spektrographischer Methoden eindeutig die sichere Trennung der freien Isothiocyanate von den proteingebundenen Farbstoffen durch die Gelfiltrierung beweisen (90).

B. Material und Methoden

Zellkultur:

Helazellen wurden in Vierkantflaschen gezüchtet, durch Einwirken von Versen abgelöst. Nach kräftigem Schütteln, wurde die Zellsuspension in Zentrifugierkolben gegossen, und 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Die suspendierten Zellen wurden in der Zählkammer ausgezählt, jeweils 200 000 Zellen in 1.5 ml Hanks Medium aufgeschwemmt und in sterile Wassermann-Röhrchen gegeben. Die Helazellen wuchsen darin nach der sog. Monolayer-Methode, auf an den Ecken umgeschmolzenen Objektträgern von 7x30 mm Grösse, bei 37°C im Brutschrank. Nach zwei Tagen Bebrütung wurde das Hanks-Medium unter sterilen Kautelen erneuert.

Kulturmedium:

Zum Anwachsen der Zellen wurde verwendet:

Hanks-Medium + 0.5% Laktalbumin Difco + 10% Kälberserum + 100 E/ml Penicillin + 100 Gamma/ml Streptomycin + Yeast. Extrakt Difco (0.1 gr/100 ml).

Zur Interferon-Herstellung wurde verwendet:

Synthetisches Medium 199 + 10% Kälberserum + 100 E/ml Penicillin + 100 Gamma/ml Streptomycin + Yeast. Extrakt (1 gr/l).

Für die Virusvermehrung kam Hanks-Medium, wie zum Anwachsen der Zellen, zur Verwendung. Statt 10% Kälberserum wurde hier jedoch nur 2% zugegeben.

Alle Kulturmedien wurden mit NaHCO₃ bis zum Umschlagspunkt des Indikators auf etwa pH 7.2 eingestellt.

Virus: Die Züchtung des Poliomyelitis-Virus Typ I ⁺) erfolgte auf Affen-nierenzellen in Vierkantflaschen. Nach vollständigem Auftreten von cytopathogenen Effekten an den Zellen, wurde durch Einfrieren auf -10°C, mit anschliessendem Auftauen und hochtourigem Zentrifugieren, im Überstand das Virus gewonnen. Anschliessend wurde auf Gewebekulturröhrchen in Verdünnungsstufen der Virustiter bestimmt. Ein erstes Auftreten von cytopathogenen Effekten war durchwegs bei einem Titer von 10⁶ zu beobachten.

Antiserum:

Für den II. Teil der Versuche kam menschliches Antiserum (Ludwig) gegen Poliomyelitis Typ I mit einem Titer von 1:512 zur Verwendung.

Dehydro-Hydrocortison:

In den Versuchen wurde Dehydro-Hydrocortison (Prednisolon = Solu-DecortinH Merck verwendet. ⁺⁺)

Interferon:

Das Interferon wurde durch Zugabe von aktivem (Virustiter 10⁶) und inaktiviertem Poliomyelitisvirus (56°C, 30 min) auf Hela-Zellkulturen in Röhrchen gewonnen. Zu einem Teil der Viruslösung wurde unmittelbar vor dem Beschicken der Zellkultur D.-Hydrocortison (Prednisolon) gegeben. Die Einwirkungszeit auf die Helazellen betrug bei 37°C im Brutschrank 3 Tage. Anschliessend wurde bei 40 000 U/min zwei Stunden lang zentrifugiert. Der Überstand musste, um lebendes Virus zu beseitigen und um das D.-Hydrocortison wieder aus der Interferonlösung zu entfernen, gegen saures Medium dialysiert werden. Hierzu wurden das Interferon und das Interferon+ D.-Hydrocortison in Dialysierschläuche gefüllt und für 12 Stunden bei 4°C im Eisschrank gegen Soerensen-Glycin-Puffer (100 ml 2mol. HCl + 122 ml 2mol. Glycin) von pH 2 dialysiert. Im Anschluss daran wurde 12 Stunden lang gegen Phosphatpuffer (1.361 g KH₂PO₄, 14.330 g Na₂HPO₄, 40.915 g NaCl = 0.01 mol. in 5 l Aqua bidest.) auf pH 7.2 zurückdialysiert. De Maeyer E. und de Maeyer J. haben bewiesen, dass sich nach der Soerensen-Dialyse nur noch 10% des D.-Hydrocortison im

⁺) freundlicherweise von den Behringwerken zur Verfügung gestellt.

⁺⁺) Statt Dehydro-Hydrocortison wurde im folgenden die Abkürzung D.-Hydrocortison verwendet.

Dialysat befinden (14). Die Bezeichnung "Interferon + D.-Hydrocortison" in den Versuchen bedeutet, dass zur Interferonherstellung D.-Hydrocortison verwendet wurde.

Die Lagerung erfolgte nach Überprüfung des pH im Eisschrank bei 4°C. Es wurde gefunden, dass sich beide Substanzen unter diesen Bedingungen 14 Tage halten.

Immunfluoreszenz:

A) Meerschweinchenantiserum:

Das Meerschweinchenantiserum wurde durch mehrmaliges Beimpfen der Tiere mit 1 cm³ inaktiviertem, auf Affennieren gewonnenem Poliomyelitisvirus Typ I vom Titer 10⁶, gewonnen. Inaktivierung der Viren geschah durch Erhitzen auf 56°C für 30 min. Das Beimpfen der Tiere erfolgte intraperitoneal, einmal wöchentlich, 3 Wochen lang. Nach 3-4 Wochen Pause erfolgte eine einmalige Boosterung mit nochmals 1 cm³ inaktiviertem Poliomyelitisvirus Typ I. Nach 4-5 Tagen wurden die Tiere entblutet und der Titer der neutralisierenden AK festgestellt. Die Meerschweinchenantiseren mit dem höchsten Titer kamen im Experiment zur Verwendung, da nach Riggs und Brown (75) die Titer der neutralisierenden Antikörper den Fluoreszenz-Antikörpertitern entsprechen.

B) Meerschweinchen-Gamma-Globulin:

Meerschweinchen wurden entblutet und aus dem Serum das Gamma-Globulin folgendermassen gewonnen: Langsam und unter ständigem Rühren wurde zu 40 ml Meerschweinchenserum 20 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugegeben. Nach längerem, kräftigem Durchmischen mit dem Magnetrührer kam dieses Gemisch in Zentrifugierkolben und wurde 15 min bei 12 000 U/min zentrifugiert. Zum Rückstand dieser ersten Fraktion, der mit 0,15 mol. Kochsalzlösung auf 20 ml aufgefüllt worden war, kam unter ständigem Rühren erneut 10 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung. Anschliessend erfolgte Zentrifugieren wie oben. Der Rückstand dieser zweiten Fraktion, der ebenso wie der erste mit 0,15 mol. Kochsalzlösung auf 20 ml aufgefüllt worden war, wurde anschliessend in Dialysierschläuche gegossen und 2 Tage gegen 0,5 l 0,15 mol. Kochsalzlösung dialysiert. Das Auswechseln der Kochsalzlösung erfolgte zweimal täglich. Um jegliches Praezipitat zu entfernen, wurde im Anschluss an den Dialysierprozess noch 15 min bei 12 000 U/min zentrifugiert. Im gradu-

ierten Messzylinder wurde der Überstand schliesslich mit 0.15mol. Kochsalzlösung auf insgesamt 22.5 ml aufgefüllt, was einer 1proz.-Gamma-Globulinlösung entspricht.

C) Kaninchen-Antimeerschweinchen-Gamma-Globulin:

Die Kaninchenimmunisierung erfolgte mit dem nach Ammoniumsulfatausfällung gewonnenen 1proz. Meerschweinchen-Gamma-Globulin nach Hummeler (37).

In der 1. Woche 3 mal 0.4 ml Gamma-Globulin i.v.

In der 2. Woche 3 mal 0.2 ml Gamma-Globulin i.v.

In der 3. Woche 3 mal 0.5 ml Gamma-Globulin i.v.

Vier Tage nach der letzten Injektion wurde entblutet und das Serum mit dem Praezipitationstest auf Anti-Gamma-Globulin-Bildung geprüft:

Das Antiserum (Kaninchenserum mit Anti-Gamma-Globulinen) wurde zu gleichen Mengen (je 0.03 ml) in kleine Röhrchen gefüllt. In jedes Röhrchen wurde ausserdem die gleiche Menge Antigen (Meerschweinchen- serum mit Gamma-Globulinen) in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10, 1:100, 1:1000) gegeben. Die Verdünnung erfolgte mit Phosphatpuffer (0.01mol. pH 7.2). Umgekehrt wurden auch Antiserumverdünnungen angelegt (1:10, 1:100, 1:1000), um mit ausreichender Sicherheit und Genauigkeit die Grössenordnung des Anti-Gamma-Globulin-Titers des Kaninchensersums bestimmen zu können. Das Ablesen der Ergebnisse erfolgte nach zweistündigem Aufbewahren der Röhrchen im Eisschrank bei 0°C. Aus den Kaninchenseren mit den höchsten Titern wurde anschliessend, nach der beschriebenen Methode, durch Ammoniumsulfatausfällung das reine Kaninchen-Anti-Meerschweinchen-Gamma-Globulin gewonnen.

D) Konjugation des Anti-Gamma-Globulin mit Fluoreszein-Isothiocyant:

In einem Erlenmeyerkolben wurden zu 22.5 ml Kaninchen-Anti-Gamma-Globulin in 0.15mol. Kochsalzlösung 2.5 ml einer 0.5mol. Carbonatpufferlösung von pH 9 gegeben. Mit einem Magnetrührer wurde 2 Stunden lang kräftig durchmischt und nach 10 mg Fluoreszein-Isothiocyantzugabe, die Durchmischung für weitere 16 Stunden fortgesetzt. Bei Absorption der freien Fluoreszeine an Mäuseleberpulver, musste das konjugierte Anti-Gamma-Globulin noch in einen Dialysierschlauch gegossen und 8 Tage lang gegen Phosphatpuffer von pH 7.2 dialysiert werden. Der Puffer wurde zweimal täglich erneuert.

E) Entfernen der nicht an Protein gebundenen Farbstoffe:

Um die freien, nicht an Eiweissmoleküle gebundenen Fluoreszenzpartikel zu entfernen, wurde nach der Methode der Sephadex-Filtrierung verfahren. In den ersten Versuchen jedoch wurde eine etwas ältere, bisher gebräuchliche Methode benützt, die hier kurz beschrieben ist.

I. Die Absorption an Mäuseleberpulver.

Wenn der Puffer, gegen den das Konjugat dialysiert worden war, keine Fluoreszenz mehr zeigte, wurde das konjugierte Anti-Gammaglobulin 15 min lang bei 12 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand kam in einen Messzylinder und wurde mit Phosphatpuffer (0.01 mol., pH 7.2) bis 25 ml aufgefüllt. Zu 2.5 ml Phosphatpuffer und 5 ml des zu absorbierenden Konjugates wurden daraufhin 0.5 g fein gemahlenes Mäuseleberpulver (aus getrockneten, homogenisierten und nach Azetonauszug zentrifugierten Mäuselebern gewonnen) gegeben. Im mechanischen Schüttelgerät kam es nach zwei Stunden zu einer groben Durchmischung. Nach 16stündiger Lagerung im Eisschrank bei 4°C, wurde das Gemisch unter kräftigem Schütteln in Zentrifugierkolben abgefüllt und bei 4°C und 12 000 U/min 15 min lang zentrifugiert. Nachdem der Überstand unter gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert worden war, schloss sich eine zweite Absorption an Mäuseleberpulver an (siehe oben). Der Überstand wurde schliesslich sorgfältig abpipettiert, in kleine Gläschen abgefüllt und bei -20°C eingefroren.

II. Entfernen der freien Farbstoffpartikel durch Gelfiltrierung mit Sephadex.

Ein Teil des Konjugates wurde nach dieser Methode gereinigt. Das trockene Sephadex G25, dessen Molekularsiebeffekt eine Trennung der freien Farbstoffmoleküle von den an Protein gebundenen Fluoreszein-Isocyanaten erlaubt, wurde zuerst bei etwa 20°C mit Aqua bidest. zum Quellen gebracht. Die Suspension blieb über Nacht stehen und wurde dann in eine Bürette auf etwas Glaswatte und einige Glasperlen gebracht. Durch die Säule lief sodann zuerst Aqua bidest., um einerseits das feinkörnige Material zu entfernen und somit die Durchflusgeschwindigkeit zu erhöhen, andererseits um die Gelkörner sedimentieren zu lassen. Sobald sich eine etwa 5 cm hohe Schicht Sephadex in der Säule gebildet hatte, wurde auf das Gelbett ein rundes Filter-

papier gelegt, damit die Körner beim Auftragen der Probelösung nicht aufgeschwemmt werden konnten. Nun wurde Aqua bidest. als Elutionsmittel aufgebracht und bis zum oberen Rand des Gelbettes abgelassen, dann die Konjugatlösung vorsichtig eingebracht und etwas mit Aqua bidest. nachgespült.

Bevor die schneller durchgelaufene Fraktion (die mit Fluoreszein markierten Proteine) die Säule ganz verlassen hatte, wurde der Bürettenhahn zugedreht, um die nachfolgenden, freien Farbstoffmoleküle in der Sephadexsäule zurückzuhalten.

Vor jedem neuen Gebrauch der Säule, wurde das Gel aus der Bürette genommen, in Wasser gewaschen und danach die Säule neu gepackt.

Färbung: Mit dem so zubereiteten Konjugat und einem Meerschweinchenantiserum von hohem Titer wurde nach der Originalmethode von Coons und Kaplan gefärbt. Zuerst war es jedoch erforderlich, in Vorversuchen geeignete Antiserum- und Konjugatverdünnungen zu finden, die eine möglichst grosse Brillanz der spezifischen Fluoreszenz und eine möglichst geringe unspezifische Fluoreszenz gewährleisten sollte. - Auf die zehn Minuten in Aceton fixierten Präparate wurde pro Objektträger etwa 0.1 ml verdünnte Meerschweinchen-Antiserumlösung gegeben (Antiserumverdünnung 1:4). Nach einer Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 30 min, in der feuchten Kammer, wurden die Präparate vorsichtig auf Filterpapier abgetupft. Dann wurden sie 20 min lang in einer mit Phosphatpuffer (0.01 mol., pH 7.2) gefüllten Waschvorrichtung mit Magnetrührer gewaschen. Auf die gewaschenen Präparate wurde noch im feuchten Zustand, pro Objektträger 0.1 ml des mit Phosphatpuffer verdünnten Konjugates (Verdünnung 1:4) aufpipettiert. In der feuchten Kammer wurde wieder bei 37°C im Brutschrank 30 min lang inkubiert, wie vorher abgetupft und gewaschen sowie zuletzt mehrmals in Aqua bidest. getaucht. Danach folgte Lufttrocknen der Präparate, Beschriften und Einbetten.

Einbettung:

Das Einbettungsmedium bestand aus gepuffertem Glycerin:

Zu 20 ml Glyz.pur. wurde 40 ml des 0.01 mol. Phosphatpuffers gegeben. Das pH des gepufferten Glycerin lag zwischen pH 6 und pH 7. Die Präparate wurden nun nach Aufbringen eines Tropfens gepufferten Glycerines auf einen normalen Objektträger von 70x26 mm Grösse, mit der Zellschicht nach unten, auf diesem eingebettet.

Die Lagerung der fertigen Präparate erfolgte in Objektträgermappen, bei 4°C im Eisschrank.

Mikroskop:

Leitz grosse Fluoreszenzeinrichtung mit UV-Filter UGI und UV-Absorptionsfilter (Sperrfilter), dunkel, 25 mm Euphos.

C. Versuche und Ergebnisse

Untersucht wurde 1. die Frage: Inwieweit beeinflusst Hydrocortison (Prednisolon) die Adsorption und intrazelluläre Virusvermehrung von Poliomyelitisvirus Typ I in der Helazelle?

In Vorversuchen wurde Prednisolon auf die in den Versuchen verwendeten Konzentrationen von 0.1 mg/ml und 0.2 mg/ml mit Hanks-Medium eingestellt und zu Hela-Zellkulturen in einer Menge von 1.5 ml für die gesamte Versuchsdauer von 12 Std., 30 min, zugesetzt. Für die betreffende Zeit ergab sich unter dem Mikroskop kein sichtbarer, toxischer Effekt an den Zellen.

Ebenso wurde in Vorversuchen der für die gegebenen Versuchsbedingungen ausreichende Endtiter des Poliomyelitisvirus Typ I, von 10^5 ermittelt. Bei dieser Verdünnungsstufe ergab sich eine relativ hohe Zahl infizierter Zellen, aber wie schon Thomssen und Mitarbeiter mitgeteilt haben, führt nicht jedes sicher vorhandene Viruspartikel zu einem cytopathogenen Effekt. Ebenso ist mit einer gewissen thermischen Inaktivierung und einem hemmenden Einfluss von Metallkationen zu rechnen (89). Die Inkonstanz dieser Einflüsse, sowie geringgradige Verdünnungsunterschiede bei den einzelnen Versuchen und die jeweils verschiedenen langen Inkubationszeiten bewirkten Schwankungen in den Infektionsraten der verschiedenen Versuche. Innerhalb des einzelnen Versuches aber waren Polioverdünnung und Inkubationszeit stets konstant. - Alle Virus und D.-Hydrocort. Verdünnungen wurden mit Hanks-Medium und 2% Serumzusatz durchgeführt. - Versuchsanordnung: Prednisolon (Dehydro-Hydrocortison) wurde auf eine Konzentration von 0.1 mg/ml und 0.2 mg/ml eingestellt. Mit jeweils 1 ml dieser Stammlösungen und 0.1 ml Poliomyelitisvirus vom Titer 10^6 wurden Reaktionsgemische hergestellt. Der Virusendtiter betrug somit 10^5 . Die Endkonzentration des D.-Hydrocortison betrug 0.1 mg/ml und 0.2 mg/ml. Daneben wurden mit Hanks Medium Polio-Kontrollen auf die gleiche Konzentration von 10^5 eingestellt. Mit den Gemischen und der Polioverdünnung wurden gut mit Hela-Zellen bewachsene, 7x30 mm grosse Objektträger in einer Menge von je 0.1 ml überschichtet.

Zur Adsorption der Viren an die Zelloberfläche und zum Eindringen der Viren in die Zelle, kamen die Objektträger (in der feuchten Kammer), für 30 min bei 37°C in den Brutschrank. Anschliessend wurden die Objektträger sorgfältig in Hanks-Medium mehrmals gewaschen und in neue, sterile Röhrchen gelegt, die bereits mit je 1.5 ml Kulturmedium und mit Hydrocortison 0.1 mgr/ml und 0.2 mgr/ml zur Virusvermehrung beschickt worden waren. Die Inkubation erfolgte über 12 Std. im Brutschrank bei 37°C, danach wurden die Präparate 10 min in Aceton fixiert, nach Coons und Kaplan gefärbt und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Das Medium der Röhrchen, in denen die Inkubation stattfand, wurde in einigen Proben auf abgelöste Zellen untersucht. Nach 10 min. Zentrifugieren bei 2000 U/min wurde in der Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Bei einer Inkubationszeit von 12 Std. war die Zahl der abgelösten Zellen relativ gering.

Die Auswertung der Versuche erfolgte an Hand von 500, bei wesentlichen Präparaten teilweise 1000 im Blindverfahren (gezählt wurde ohne Kenntnis des Präparates) ausgezählten Hela-Zellen. Die Zellen wurden nach Hinuma und Hummeler (33) bezüglich ihrer Leuchtkraft, also nach dem Grad der intrazellulären Virusvermehrung eingestuft und in Prozentzahlen angegeben, da sich damit, wie ähnliche Experimente zeigen (32, 33, 65), die besten Vergleichsmöglichkeiten ergeben. Der 1. Grad der Fluoreszenz, entsprechend dem Stadium I nach Hinuma und Hummeler (33) wird in den Tabellen mit (+) bezeichnet. Der 2. Grad der Fluoreszenz, entsprechend dem Stadium II mit (++). Der 3. Grad der Fluoreszenz, respektive Stadium III, wird in den Tabellen mit der Bezeichnung (+++) wiedergegeben. Nicht fluoreszierende, also nicht infizierte Zellen, erhalten die Benennung (o).

In jedem Versuch liefen auch mit Hela-Zellen bewachsene Objektträger mit, die weder infiziert, noch mit D.-Hydrocortison behandelt worden waren. Sie wurden als Hela-Kontrollen bezeichnet und dienten der Überprüfung der Spezifität in der Immunfluoreszenz.

Versuch 1

Bebrütungszeit 12 Std.	o	+	++	+++
Polio I	21 %	5 %	2 %	72 %
Polio I + D.-Hydroc. 0.1 mg/ml	22 %	8 %	7 %	63 %
Polio I + D.-Hydroc. 0.2 mg/ml	25 %	2 %	5 %	68 %
D.-Hydroc. 0.1 mg/ml (Kontrolle)	100 %	-	-	-
D.-Hydroc. 0.2 mg/ml (Kontrolle)	100 %	-	-	-
Hela-Kontrolle	100 %	-	-	-

Versuch 2

Bebrütungszeit 12 Std.	o	+	++	+++
Polio I	38 %	14 %	13 %	35 %
Polio I + D.-Hydroc. 0.1 mg/ml	42 %	13 %	16 %	29 %
Polio I + D.-Hydroc. 0.2 mg/ml	44 %	12 %	21 %	23 %
D.-Hydroc. 0.1 mg/ml (Kontrolle)	100 %	-	-	-
D.-Hydroc. 0.2 mg/ml	100 %	-	-	-
Hela-Kontrolle	100 %	-	-	-

Bei Versuch 3 wurden die Versuchsbedingungen etwas geändert. Poliomyelitis und D.-Hydrocortison-Verdünnungen blieben gleich. Das Gemisch der beiden Lösungen sowie die reine Poliomyelitisverdünnung wurden aber hier, an Stelle des Übersichtens der Objektträger, in einer Menge von 1.5 ml in Wassermannröhrchen gefüllt. Anschliessend wurden die Objektträger mit ausgewachsenen Helazellen (7x30 mm) in die Röhrchen eingebracht und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bebrütung, Fixierung und Färbung wie bei den Versuchen vorher.

Versuch 3

Bebrütungszeit 12 Std.	o	+	++	+++
Polio I	5 %	1 %	2 %	92 %
Polio I + D.-Hydroc. 0.1 mg/ml	7 %	5 %	7 %	81 %
Polio I + D.-Hydroc. 0.2 mg/ml	11 %	2 %	4 %	83 %
D.-Hydroc. 0.2 mg/ml (Kontrolle)	100 %	-	-	-
Hela-Kontrolle	100 %	-	-	-

Aus den Tabellen ist zu entnehmen, dass die Werte der mit D.-Hydrocortison versetzten Präparate kaum von denen der Polio-Kontrolle abweichen. Auch ergibt sich keine Abhängigkeit der Ergebnisse von der Höhe der Cortisonkonzentration. Bei Versuch 3 sind die Infektionsraten offenbar durch das erhöhte Beimpfungs-volumen verstärkt. Aber auch hier weichen die Werte der D.-Hydrocortisonpräparate nicht signifikant von der Polio-Kontrolle ab.

2. Inwieweit beeinflusst D.-Hydrocortison in vitro die Neutralisation menschlicher Antikörper durch das Poliomyelitis-Virus Typ I ?

Darnell und Sawyer beschrieben in ihren Versuchen über die Eklipse und Penetration des Poliomyelitis-Virus in die Helazelle eine Neutralisation des Virus (0.1 PFU/Zelle) mit Antiserum (Verdünnung 1:60), durch das das freie Virus in 7.5 min zu 99-99.5% abgesättigt wurde (13).

Davon ausgehend wollten wir den Einfluss von D.-Hydrocortison auf die einsetzende, aber noch nicht komplette Neutralisation prüfen. Wir wählten deshalb auf Grund von Vorversuchen eine Neutralisationszeit von 2 min, menschliches Antiserum gegen Poliomyelitis-I vom Titer 512, Poliomyelitis Virus Typ I mit den Titern 10^4 und 10^6 , und D.-Hydrocortison (Solu-Decortin-H-Merck) 10 mg. Die Verdünnungen wurden mit Hanks-Medium bei 2% Kälberserumzusatz ausgeführt. Das Virus wurde dabei auf eine Endkonzentration von 10^3 und 10^5 , das Antiserum auf 1:100 und das D.-Hydrocortison auf eine Endverdünnung von 0.2, 0.5, 1.0 und 2.0 mgr/ml eingestellt.

Versuchsordnung: Ein Wassermannröhrchen wurde mit einem Reaktionsgemisch beschickt, bestehend aus: jeweils 0.1 ml D.-Hydrocortison, 0.1 ml Polio-Virus und 0.1 ml Humanantiserum.

Auf gleiche Weise wurden als Kontrollen Poliomyelitis-Humanantiserum-Gemische, Poliomyelitis-D.-Hydrocortison-Gemische und reine Poliomyelitis-Verdünnungen hergestellt.

Die D.-Hydrocortison und Virus-Konzentrationen wurden wie angegeben in den einzelnen Versuchen variiert, die Antiserumverdünnung konstant gehalten.

Die Gemische gelangten 2 min unter gutem Durchmischen bei 37°C zur Reaktion und wurden dann in einer Menge von 0.1 ml auf die mit Hela-Zellen bewachsenen Objektträger aufgebracht. Anschliessend wurde 30 min in der feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert, danach die Objektträger mehrfach in Hanks Medium gewaschen und zur Virusvermehrung in neuen, sterilen Röhrchen in je 1.5 ml Hanks mit 2% Serumzusatz bebrütet. Die Bebrütungszeit betrug bei den

einzelnen Versuchen 9 bzw. 11 Std.. Anschliessend erfolgte Acetonfixierung für 10 min und die Färbung der Präparate nach Coons und Kaplan. Wir werteten die Zellen nach der erfolgten intrazellulären Virusvermehrung aus. 500 Zellen wurden ausgezählt und nach dem Grad der Fluoreszenz in 3 Stadien eingeteilt. Zur besseren Vergleichsmöglichkeit wurden die Werte in % angegeben.

Versuch 1

Poliotiter 10^5

Inkubation 9 Std.

	0	+	++	+++
Polio + Humanantiserum	39%	15%	22%	24%
Polio + Humanantiserum	35%	17%	28%	20%
Polio + Humanantiserum	37%	16%	29%	18%
Polio + Humanantiserum	45%	10%	26%	19%
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	33%	12%	41%	14%
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	27%	19%	29%	25%
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	22%	12%	37%	29%
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	26%	9%	43%	22%
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.2 mg/ml	43%	10%	29%	18%
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.2 mg/ml	46%	13%	23%	18%
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.2 mg/ml	44%	10%	25%	21%
Polio-Kontrolle	23%	8%	28%	41%
Polio + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml-Kontrolle	20%	12%	32%	36%
mittlerer Fehler d. Mittelw.:	$X_{\max} = \pm 3.1\%$			

Versuch 2

Poliotiter 10^5

Inkubation 9 Std.

	0	+	++	+++
Polio + Humanantiserum	47%	9%	28%	16%
Polio + Humanantiserum	47%	12%	26%	15%
Polio + Humanantiserum	47%	8%	21%	24%
Polio + Humanantiserum	49%	10%	19%	22%
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	50%	9%	30%	11%
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	53%	14%	27%	6%

Versuch 2 (Fortsetzung)

	0	+	++	+++
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	32 %	9 %	22 %	37 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	24 %	10 %	31 %	35 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	26 %	10 %	22 %	42 %
Polio-Kontrolle	12 %	3 %	30 %	55 %
Polio-Kontrolle	12 %	4 %	25 %	59 %
Polio + D.-Hydrocort. 1.0 mg/ml Ko.	12 %	5 %	32 %	51 %
Polio + D.-Hydrocort. 0.5 mg/ml Ko.	15 %	7 %	36 %	42 %
Polio + D.-Hydrocort. 0.5 mg/ml Ko.	17 %	6 %	25 %	52 %

Xmax = $\pm$ 3.0 %

Versuch 3

Poliotiter 10³

Inkubation 9 Std.

	0	+	++	+++
Polio + Humanantisera	77 %	18 %	4 %	1 %
Polio + Humanantisera	74 %	18 %	6 %	2 %
Polio + Humanantisera	74 %	21 %	4 %	1 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	66 %	22 %	10 %	2 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	69 %	21 %	8 %	2 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	69 %	21 %	7 %	3 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	73 %	18 %	6 %	3 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	57 %	21 %	18 %	4 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	57 %	30 %	11 %	2 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	56 %	30 %	10 %	4 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	59 %	30 %	10 %	1 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	55 %	30 %	11 %	4 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	59 %	28 %	9 %	4 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	53 %	35 %	9 %	3 %
Polio-Kontrolle	50 %	26 %	18 %	6 %
Polio-Kontrolle	45 %	35 %	16 %	4 %
Polio-Kontrolle	49 %	33 %	12 %	6 %

Versuch 3 (Fortsetzung)

	o	+	++	+++
Polio + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml Kontrolle	54 %	23 %	16 %	7 %
Polio + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml Kontrolle	56 %	29 %	10 %	5 %
Polio + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml Kontrolle	50 %	29 %	14 %	7 %
	Xmax = $\pm$ 3.0 %			

Versuch 4

Poliotiter 10³

Inkubation 11 Std.

	o	+	++	+++
Polio + Humanantiserum	81 %	16 %	3 %	-
Polio + Humanantiserum	80 %	14 %	5 %	1 %
Polio + Humanantiserum	79 %	17 %	3 %	1 %
Polio + Humanantiserum	81 %	14 %	4 %	1 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	80 %	17 %	3 %	-
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	74 %	21 %	5 %	-
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	78 %	17 %	5 %	-
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	79 %	17 %	4 %	-
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	62 %	31 %	6 %	1 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	56 %	37 %	7 %	-
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	64 %	31 %	4 %	1 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	52 %	33 %	12 %	3 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	60 %	30 %	8 %	2 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	53 %	35 %	10 %	2 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	57 %	35 %	6 %	2 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	55 %	31 %	10 %	4 %
Polio-Kontrolle	45 %	25 %	22 %	8 %
Polio-Kontrolle	53 %	23 %	18 %	6 %
Polio-Kontrolle	51 %	30 %	15 %	4 %
Polio + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml Kontrolle	48 %	29 %	17 %	6 %
Polio + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml Kontrolle	52 %	28 %	14 %	6 %
Polio + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml Kontrolle	52 %	27 %	14 %	7 %
	Xmax = $\pm$ 2.8 %			

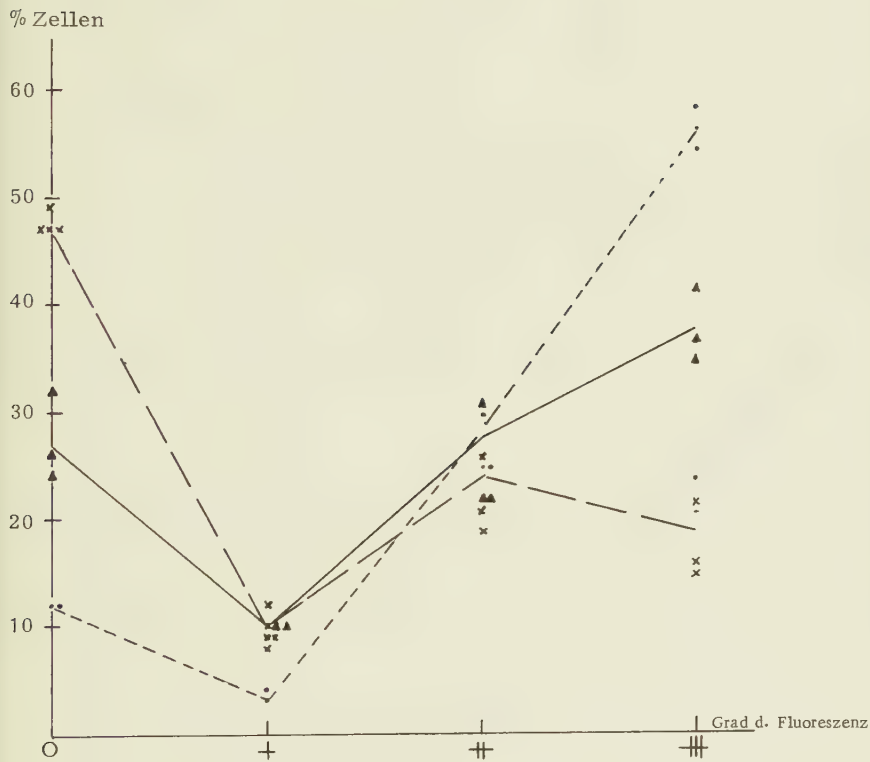
Versuch 5

Poliotiter 10^3

Inkubation 9 Std.

	0	+	++	+++
Polio + Humanantiserum	78 %	16 %	4 %	2 %
Polio + Humanantiserum	81 %	17 %	2 %	-
Polio + Humanantiserum	82 %	15 %	3 %	-
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	71 %	20 %	8 %	1 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	75 %	19 %	5 %	1 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	77 %	17 %	5 %	1 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 0.5 mg/ml	73 %	21 %	4 %	2 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	63 %	28 %	9 %	-
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	55 %	35 %	8 %	2 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	59 %	30 %	9 %	2 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml	60 %	33 %	6 %	1 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	59 %	32 %	8 %	1 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	59 %	29 %	10 %	2 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	63 %	27 %	7 %	3 %
Polio + H.Antis. + D.-Hydroc. 2.0 mg/ml	59 %	32 %	6 %	3 %
Polio-Kontrolle	56 %	29 %	11 %	4 %
Polio-Kontrolle	53 %	31 %	13 %	3 %
Polio-Kontrolle	49 %	34 %	12 %	5 %
Polio + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml Kontrolle	51 %	35 %	10 %	4 %
Polio + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml Kontrolle	50 %	33 %	13 %	4 %
Polio + D.-Hydroc. 1.0 mg/ml Kontrolle	57 %	31 %	9 %	3 %

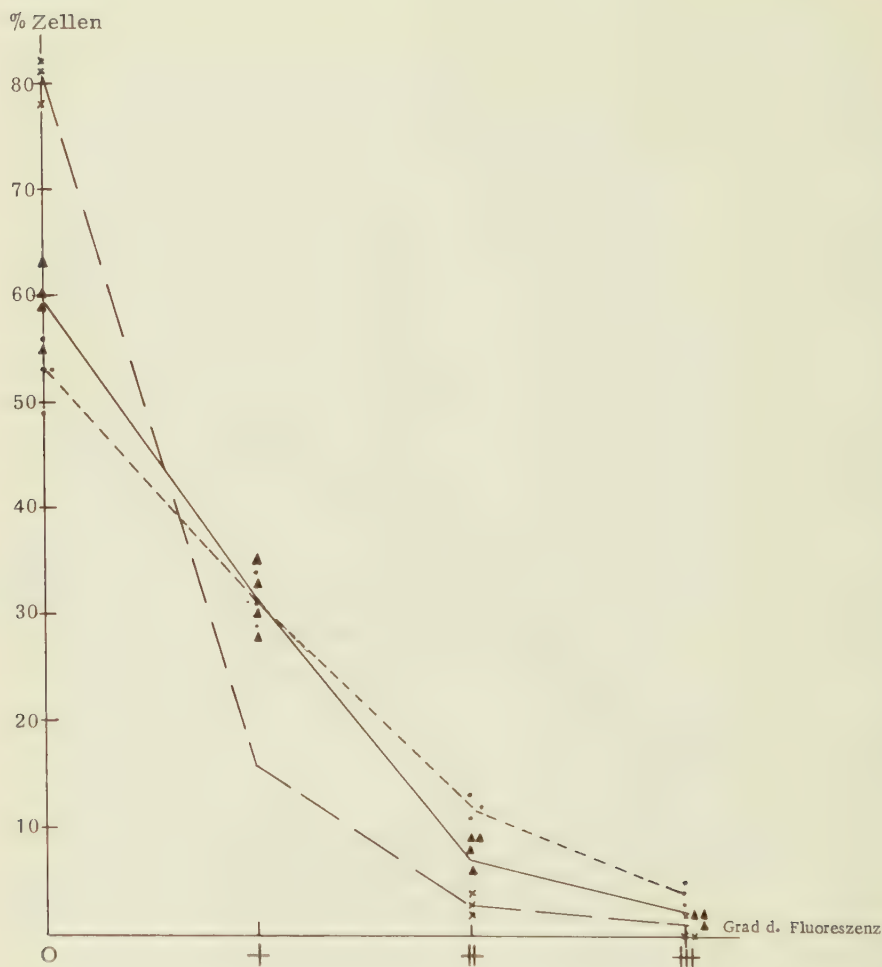
Xmax = $\pm$ 1.5 %



Figur 1 (nach Versuch 2)

Virustiter 10^5 . Inkubationszeit 9 Std.

- Gepunktete Linie = Polio-Kontrolle
Durchbrochene Linie = Polio + H.Antis.
Ausgezogene Linie = Polio + H.Antis. + D.-Hydrocort.



Figur 2 (nach Versuch 5)

Virustiter 10^3 . Inkubationszeit 9 Std.

Gepunktete Linie = Polio-Kontrolle

Durchbrochene Linie = Polio + H. Antis.

Ausgezogene Linie = Polio + H. Antis. + D.-Hydrocort.

Wie aus den Tabellen sowie Fig. 1 und 2 zu entnehmen ist, zeigen die Polio-Humanantiserum-Gemische, denen in Konzentrationen von 1.0 und 2.0 mgr/ml D.-Hydrocortison zugesetzt wurde, eine signifikant erhöhte Infektionsrate. Nach Zugabe von 0.5 mg/ml D.-Hydrocortison ist die Infektionsrate nicht signifikant erhöht, bei Zusatz von 0.2 mg/ml D.-Hydrocortison zum Polio-Humanantiserum-Neutralisationsgemisch, ist kein Effekt zu ersehen (siehe Tabellen). Die Wirkung von D.-Hydrocortison 1.0 mg/ml entspricht in den Versuchen etwa der von D.-Hydrocortison 2.0 mg/ml. In Figur 1 ist der zeitliche Ablauf der intrazellulären Virusvermehrung (ausgedrückt im Fluoreszenzgrad nach Hinuma und Hummeler) nach 9 Std. bei einem Virustiter von 10^5 schematisch wiedergegeben. Aus den Kurven von Figur 1 ist ersichtlich, dass die Zahl der nicht infizierten Zellen der Präparate, die mit Polio-Antiserum-D.-Hydrocortison beschickt wurden (Stadium 0), deutlich unter denen der Polio-Humanantiserum-Kontrollen liegen. In den Stadien der geringen Virusvermehrung (Stadium 1 und 2) ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Im Stadium der stärksten Virusvermehrung dagegen findet man bei den Polio-Humanantiserum-D.-Hydrocortison-Präparaten eine rund doppelt so hohe Infektionsrate wie bei den Polio-Humanantiserum-Kontrollen. Figur 2 zeigt den Einfluss des D.-Hydrocortison auf das Polio-Antiserum-Neutralisationsgemisch bei einem Virustiter von 10^3 und einer Inkubationszeit von 9 Std.. Die Infektion ist hier bedeutend schwächer. Das D.-Hydrocortison aber zeigt einen deutlichen Effekt. Die Zahl der nicht infizierten Zellen der Polio-Humanantiserum-D.-Hydrocortison-Präparate ist im Verhältnis zur Polio-Antiserum-Kontrolle stark verringert. Der Verlauf der Kurve der mit D.-Hydrocortison versetzten Präparate passt sich stark dem der Polio-Kontrolle an. Die bei der höheren Viruskonzentration in Figur 1 aufgetretene Divergenz der Werte bei den Polio-Antiserum und den mit D.-Hydrocortison versetzten Neutralisationsgemischen, im Stadium der stärksten Virusvermehrung, verschiebt sich hier zum Stadium 1 hin. In Stadium 2 (++) ist der D.-Hydrocortison einfluss noch deutlich ausgeprägt. Im Stadium 3 (+++) ist die Zahl der infizierten Zellen so gering geworden, dass eine Aussage praktisch nicht mehr möglich ist.

Als 3. und letzte Frage interessierte, ob D.-Hydrocortison einen quantitativen Einfluss auf die Interferonbildung besitzt.

In Vorversuchen wurde die später in den Experimenten verwendete D.-Hydrocortisonkonzentration, auf eine eventuelle Zelltoxizität untersucht. D.-Hydrocortison wurde mit Hanks Medium auf 0.2 mg/ml eingestellt und damit Hela-Zellkulturen beschickt. Bis zu drei Tagen Einwirkungszeit ergab sich kein

sichtbarer, toxischer Effekt. Diese Befunde decken sich etwa mit den Ergebnissen von J.S. Willington und H.D. Moon, sowie Rivera und Mitarbeitern. Das Interferon und das Interferon + D.-Hydrocortison wurden, wie erwähnt, mit aktivem, sowie inaktivem Poliomyelitisvirus (30 min Erhitzen bei 56°C) hergestellt und nach Soerensen-Dialyse und Verdünnung mit Hanks-Medium, in Verdünnungsstufen von 1:2, 1:4 und 1:8 in den Versuchen verwendet.

Versuchsanordnung: Auf gut in Wassermann-Röhrchen ausgewachsene Hela-Zellkulturen wurde je 1.5 ml Interferon bzw. Interferon + D.-Hydrocortison gebracht, anschliessend für 2 bzw. 16 Std. im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Präparate nach kurzem Abtropfen auf Filterpapier in frischen Röhrchen mit je 1.5 ml Poliomyelitisvirus (Endtiter 10⁵) überschichtet und für 40 min bzw. 1 Std. bei 37°C bebrütet. Die Virusvermehrung erfolgte in neuem Medium TC 199 über 10, in anderen Versuchen über 12 Std.. Im Anschluss daran wurde in Aceton 10 min lang fixiert und nach Coons und Kaplan gefärbt. Wie bereits beschrieben werteten wir auch hier 500, unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählte Helazellen, nach dem Grad der Fluoreszenz, entsprechend der erfolgten intrazellulären Virusvermehrung aus.

In den folgenden Tabellen wurde, der besseren Übersicht halber, reines Interferon als Interferon A und Interferon + D.-Hydrocortison 0.2 mg/ml als Interferon B bezeichnet.

Versuch 1

Zellinkubation mit Interferon A bzw. Interferon B: 2 Std.

Challenge mit Poliomyelitis-Virus: 40 min

Bebrütung in Hanks-Medium: 12 Std.

	0	+	++	+++
Polio + Interferon A unverd.	20%	15%	12%	53%
Polio + Interferon B unverd.	10%	11%	24%	55%
Polio-Kontrolle	1%	5%	13%	81%

Versuch 2

Zellinkubation mit Interferon A, bzw. Interferon B: 16 Std.

Challenge mit Poliomyelitis-Virus: 1 Std.

Bebrütung in Hanks-Medium: 10 Std.

	0	+	++	+++
Polio + Interferon A 1:2 verd.	45%	24%	24%	7%
Polio + Interferon B 1:2 verd.	26%	14%	42%	19%
Polio-Kontrolle	17%	27%	25%	31%

Versuch 3

Versuchsbedingungen wie bei Versuch 2

	0	+	++	+++
Polio + Interferon A 1:2 verd.	42%	26%	26%	6%
Polio + Interferon B 1:2 verd.	27%	21%	37%	15%
Polio + Interferon A 1:4 verd.	41%	17%	35%	7%
Polio + Interferon A 1:4 verd.	42%	16%	31%	11%
Polio + Interferon B 1:4 verd.	34%	15%	43%	8%
Polio + Interferon B 1:4 verd.	34%	15%	46%	5%
Polio-Kontrolle	13%	10%	19%	58%

Versuch 4

Versuchsbedingungen wie bei Versuch 2

	0	+	++	+++
Polio + Interferon A 1:4 verd.	57%	18%	17%	8%
Polio + Interferon B 1:4 verd.	41%	22%	26%	11%
Polio-Kontrolle	32%	16%	32%	20%

Versuch 5

Versuchsbedingungen wie bei Versuch 2

	0	+	++	+++
Polio + Interferon A 1:4 verd.	41%	32%	26%	1%
Polio + Interferon B 1:4 verd.	28%	32%	32%	8%
Polio-Kontrolle	18%	17%	28%	37%

Versuch 6

Versuchsbedingungen wie bei Versuch 2

	0	+	++	+++
Polio + Interferon A 1:2 verd.	50%	24%	19%	7%
Polio + Interferon A 1:2 verd.	52%	20%	22%	6%
Polio + Interferon B 1:2 verd.	30%	22%	33%	15%
Polio + Interferon B 1:2 verd.	34%	24%	34%	8%
Polio + Interferon A 1:4 verd.	50%	17%	22%	11%
Polio + Interferon A 1:4 verd.	51%	22%	24%	3%
Polio + Interferon B 1:4 verd.	35%	27%	32%	6%
Polio + Interferon B 1:4 verd.	37%	24%	29%	10%
Polio + Interferon A 1:8 verd.	47%	20%	26%	7%
Polio + Interferon A 1:8 verd.	52%	17%	25%	6%
Polio + Interferon B 1:8 verd.	35%	24%	35%	6%
Polio + Interferon B 1:8 verd.	33%	20%	38%	9%
Polio-Kontrolle	12%	14%	51%	23%
Polio-Kontrolle	12%	17%	53%	18%

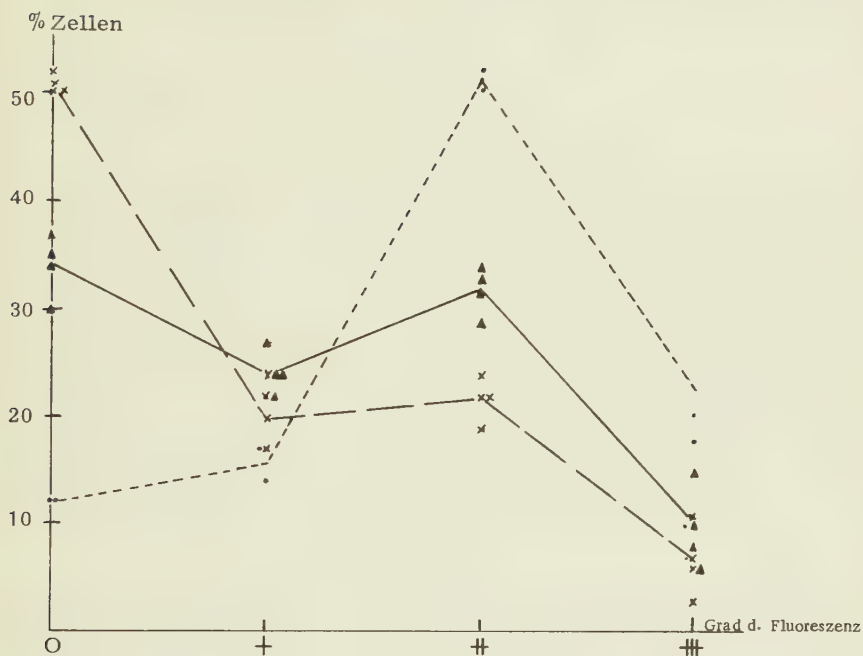
Versuch 7

Versuchsbedingungen wie bei Versuch 2

	0	+	++	+++
Polio + Interferon A 1:8 verd.	43%	14%	28%	15%
Polio + Interferon B 1:8 verd.	30%	23%	37%	10%
Polio-Kontrolle	25%	23%	39%	13%

Zu allen Versuchen wurden Hela-Kontrollen und Interferon-Kontrollen (ohne Polio-Challenge) angefertigt. Sie waren konstant negativ.

Aus den Versuchen (siehe Tabellen und Figur 3) ergibt sich eine deutliche Depression der Zellinfektionsrate bei den mit Interferon behandelten Präparaten gegenüber den Polio-Kontrollen (zwischen 20 und 40%). Ausserdem zeigt sich eine konstant niedrigere Quote der nicht infizierten Zellen bei den mit D.-Hydrocortison versetzten Kulturen, gegenüber den Interferonpräparaten (zwischen 10 und 20%). Daneben ist bei den mit D.-Hydrocortison behandelten Interferonpräparaten im Vergleich zur Interferon + Polio-Kontrolle eine konstant über 10% liegende Verschiebung in der intrazellulären Virusvermehrung (von einfach positiv zu zweifach positiv) zu beobachten. Aus Versuch 1 ist zu erkennen,



Figur 3

Inkubationszeit 10 Std.

Gepunktete Linie = Polio-Kontrolle

Durchbrochene Linie = Polio + Interferon

Ausgezogene Linie = Polio + Interferon + D.-Hydrocortison

dass bereits nach zweistündiger Inkubation der Zellen mit Interferon, eine offensichtliche Depression der Infektionsrate eintritt. In der gleichen Zeit kommt es aber auch hier, bei den mit Hydrocortison behandelten Interferonpräparaten zu einer deutlichen Vermehrung der Infektionsrate und zu einer Verschiebung auf die Seite der stärkeren intrazellulären Virusvermehrung.

D. Diskussion

Auf Grund zahlreicher Arbeiten der letzten Jahre kann ein Einfluss von Cortison auf zahlreiche Virusinfektionen als erwiesen angenommen werden (14, 16, 18, 43, 46, 48, 53, 82, 84, 85, 88). Der Angriffspunkt des Hormones und sein Wirkungsmechanismus aber liegen noch weitgehend im Dunkeln. Um zur Klärung dieses Problem es einen Beitrag zu leisten, wurde in einem möglichst breiten Rahmen der Einfluss von D.-Hydrocortison auf das Poliomyelitisvirus an der Hela-Zellkultur studiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen natürlich keine Rückschlüsse auf die Cortisonmedikation bei Virusinfektionen allgemein zu, wurden sie doch in einer speziellen Untersuchung über das Poliomyelitisvirus Typ I gewonnen. Vielleicht können sie aber doch einige Hinweise zu diesem wichtigen Problem geben.

Als Arbeitsmethode wurde das Immunfluoreszenzverfahren gewählt, das neben quantitativen auch qualitative Aussagen zulässt (32, 33, 98). Zur Bestimmung der Konzentration eines infektiösen Virus durch das Zählen fluoreszenzmarkierter Zellen eignet sich die Methode besonders gut. Wheelock und Tamm haben die drei gebräuchlichsten, quantitativen Verfahren, die Endpunkttitration, die Plaque-Forming-Bestimmung und die Immunfluoreszenzmethode, in einer Bestimmung der Konzentration von infektiösem Newcastle-Disease-Virus, gegenübergestellt. Das Zählen der Plaques, sowie der markierten Zellen ergab gut übereinstimmende, konstante Werte. Beide Verfahren waren gleichermassen sehr viel präziser, als die Endpunkttitration mit Bestimmung der 50%-Infektionsrate (98). Auch Henle fand in seinen Experimenten eine gute quant. Übereinstimmung des Prozentsatzes fluoreszierender Zellen mit den jeweiligen Infektionsraten (32).

Neben der quantitativen Erfassung der Infektionsrate gestattet die Immunfluoreszenztechnik, wie Hinuma und Hummeler gezeigt haben, auch Aussagen über den Verlauf der direkten intrazellulären Virusvermehrung durch Bestimmung des Fluoreszenzgrades (33). Das einfache Ablesen des Fluoreszenzgrades und

die Einordnung der infizierten Zellen in Stadien, ersetzt hier elegant und vergleichsweise sehr viel rascher, die Methode der Titration des intrazellulären Virus nach Zerstören der infizierten Zellen. In Untersuchungen über die intrazelluläre Virussyntese haben Hinuma und Hummeler (33) sowie Roizman, Höpken und Mayer (78) gezeigt, daß die durch Immunfluoreszenz erfassbare, spezifische Antigenproduktion (i.e. das Protein) etwa gleichzeitig mit der Produktion des reifen Virus einhergeht.

Die praktische Durchführung eines Experimentes mit der Immunfluoreszenzmethode geht relativ rasch und vergleichsweise einfach vor sich. Geringe pH-Abweichungen der Stammlösungen, nicht ganz exakt konstant zu haltende Beimischungsvolumina, sowie verschieden große Zellpopulationen bei den einzelnen Versuchen, beeinflussen die Infektionsraten der einzelnen Versuche erheblich, stellen aber insgesamt keine grosse Fehlerquelle dar, da nicht die einzelnen Versuche miteinander, sondern stets nur die einzelnen Ergebnisse eines Versuches untereinander, zum Vergleich herangezogen wurden. Die in den einzelnen Experimenten angegebenen Adsorptions- und Virusvermehrungszeiten wurden auf Grund der Untersuchungen von Darnell und Sawyer (13, Mandel (62) sowie Roizman und Mitarbeiter (78) gewählt. Zur Diskussion steht 1. ein Einfluss von D.-Hydrocortison auf die Adsorption und intrazelluläre Vermehrung des Poliomyelitisvirus Typ I.

In der Literatur finden sich bei den in-vivo, als auch bei in-vitro-Versuchen keine einheitlichen Angaben über die Wirkung des Cortison auf die Vermehrung verschiedener Viren (44, 46, 52, 53, 85, 94, 97). So fand Kilbourne in zahlreichen Versuchen mit Influenza-Viren am Brutei bei Hydrocortisondosen von 1 Mikrogramm/ml bis 0.1 mg/ml stets eine initiale Hemmung der Virussyntese, vor einer überschüssigen Virusproduktion (51, 52). V. Wasielewski fand in embryonalen Bruteiern und auf der Allantoismembran bei Versuchen mit Influenza-B-Lee-Virus eine gesteigerte Virusausschüttung nach Cortisongabe (94). Wheeler, Harvie und Canby, die die Wirkung von Hydrocortison auf die Produktion von Herpes simplex-Virus in der Zellkultur studierten, fanden keinen konstanten und signifikanten Einfluss des Hormones auf die Herpes-Virus-Vermehrung (97). Die eigene Untersuchung, über einen Einfluss von Hydrocortison auf das Poliovirus, befasste sich, wie aus der Beschreibung der Methode hervorgeht, nur mit der intrazellulären Virusvermehrung, läßt also keinerlei Schlüsse auf eine mögliche D.-Hydrocortisonbeeinflussung der extrazellulären Viruszahl zu.

Wie aus der Tabelle hervorging, ergaben sich in Prozentzahl und Fluoreszenzgrad keine konstanten und signifikanten Abweichungen der mit D.-Hydrocortison versetzten Zellkulturen gegenüber den Polio-Kontrollen. Das bedeutet, dass das D.-Hydrocortison weder einen Einfluss auf die Adsorption des Virus an die Zelle, noch auf den Eintritt des Viruspartikels in die Zelle, noch auf die intrazelluläre Virusvermehrung besitzt. Ein Effekt des Hormones im Sinne einer Beschleunigung oder Hemmung des Adsorptions- oder Penetrations-Vorganges müsste ja zu einer relativ zeitlichen Verlängerung oder Verkürzung der Virusvermehrung führen, die ihrerseits in einer Verschiebung im Fluoreszenzgrad zu beobachten wäre. Eine vermehrte Adsorption oder eine vermehrte Penetration des Virus in die Zelle, müsste zu einer erhöhten Infektionsrate führen, eine beschleunigte intrazelluläre Virusvermehrung müsste sich in einer Verschiebung auf die Seite des stärkeren Fluoreszenzgrades äussern.

In Versuch 3, der mit einem erhöhten Beimpfungsvolumen des Polio-Hydrocortison-Reaktionsgemisches durchgeführt wurde, zeigte sich neben der zu erwartenden Erhöhung der Infektionsrate, auch das überraschende Phänomen einer beschleunigt ablaufenden intrazellulären Virusvermehrung ersichtlich an einer ausgeprägten Verschiebung des Verhältnisses nicht infizierte Zelle: stark infizierte Zelle, auf die Seite der stärksten Infektion (Stadium +++). Dieses Phänomen ist bei allen Präparaten dieses Versuches zu beobachten, ist also unabhängig von der Wirkung des Hormones. Hinuma und Hummeler beschrieben 1961 in einer Untersuchung über die Kinetik der Antigensynthese des Poliomyelitisvirus, eine deutliche Abhängigkeit des erstmals in der Zelle nachzuweisenden Antigenes von der Grösse der Viruskonzentration: Bei einer Viruskonzentration von 380 PFU/Zelle war die intrazelluläre Virusvermehrung mit Immunfluoreszenz bereits 2 Std. post infectionem nachzuweisen, bei einer Viruskonzentration von 26 PFU/Zelle nach 3 Std. und bei 0.26 PFU/Zelle erst nach 4 Std. (33). Diese Zusammenhänge würden die beobachtete, beschleunigte intrazelluläre Virusvermehrung bei erhöhtem Beimpfungsvolumen gut erklären. Die hier früher einsetzende Virusvermehrung würde zu einer relativ längeren Vermehrungsdauer und damit zu einer stärkeren intrazellulären Virusvermehrung führen.

Zur Diskussion steht 2. die Frage eines Einflusses von D.-Hydrocortison auf die beginnende Neutralisation des Poliomyelitisvirus Typ I mit Humanantiserum. Wie aus den Tabellen und Kurven zu entnehmen ist, scheint das D.-Hydrocortison eine deutliche Wirkung auf die Neutralisation des Poliomyelitisvirus mit Humanantikörpern zu besitzen. Es kommt bei einer noch nicht beendeten Neutralisa-

tionsreaktion durch Hormonzugabe einmal zu einer signifikant erhöhten Infektionsrate, zum anderen bei der Verwendung eines Virus mit höherem Titer, auch zu einem schnelleren Ablauf der intrazellulären Virusvermehrung. Die Ursache dieser D.-Hydrocortisonwirkung ist noch nicht bekannt. Möglicherweise greift das Hormon direkt in den Mechanismus der Antigen-Antikörper-Reaktion ein. Die Annahme eines derartigen Wirkungsmechanismus würde die hier gefundenen Werte ganz gut zu erklären vermögen. Eine Einwirkung des D.-Hydrocortison auf die Antigen-Antikörper-Komplexe im Sinn einer Spaltung derselben oder einer Verhinderung oder Verzögerung ihrer Bildung würde in jedem Falle zu einer Erhöhung der für die Zelle wirksamen Viruskonzentration führen. Eine erhöhte Infektionsrate der Zellen im Vergleich zu den mit reinen Antigen-Antikörper-Gemisch beschickten Zellkulturen müßte sich immunfluoreszenztechnisch nachweisen lassen. Daneben wäre zu fordern, daß die Infektionsrate der Polio-Humanantiserum-D.-Hydrocortison-Präparate unter der der reinen Polio-Kontrolle liegt. Beides zeigt sich in den Versuchsergebnissen. Auch die im Vergleich zur Polio-Kontrolle verlangsamt, dagegen vergleichsweise zur Polio-Humanantiserum-Kontrolle beschleunigt ablaufende intrazelluläre Virusvermehrung wäre gut erklärbar. Die wirksame Viruskonzentration der Polio-Humanantiserum-D.-Hydrocortison-Gemische müßte ja niedriger als die Viruskonzentration der Polio-Kontrolle und höher als die der Polio-Humanantiserum-Kontrolle sein. Nach Hinuma und Hummeler würden sich aber die verschiedenen grossen Viruskonzentrationen in einer verschieden schnell einsetzenden intrazellulären Virusvermehrung äussern. Das würde heissen, die relative Zeit der Virusvermehrung bei den mit Hormon behandelten Neutralisationsgemischen würde kürzer als bei den Polio-Kontrollen und länger als bei den Polio-Humanantiserum-Kontrollen sein. Die beschleunigte intrazelluläre Virusvermehrung, also die Verschiebung auf die Seite der starken Fluoreszenz wäre die Folge. Dieser Befund ergibt sich in den Tabellen und Kurven.

Der Unterschied des Kurvenbildes bei niedrigem Virustiter gegenüber demjenigen bei hohem Virustiter könnte grundsätzlich auf den gleichen Überlegungen basieren. Durch die absolute Erniedrigung der Viruskonzentration (bei Fig. 2), die alle drei Versuchsbedingungen gleichermassen betrifft, geht aus dem oben gesagten hervor, dass alle drei Kurven auf die Seite der schwachen Fluoreszenz verschoben sein müssen. Die relativ etwas stärkere D.-Hydrocortisonwirkung bei Fig. 2, die man aus dem verwandten Kurvenverlauf der Polio-Humanantiserum-D.-Hydrocortison-Präparate und der Polio-Kontrolle entnehmen könnte, kommt

wohl nur scheinbar zustande. Es ist wahrscheinlicher, dass bei einem Virus-
endtitert von 10^3 die Neutralisation in 2 min bereits ziemlich komplett ist, und
die freigewordene Virusmenge durch D.-Hydrocortisonzugabe sich bei der Ad-
sorption und intrazellulären Virusvermehrung nicht mehr stark von der
der Polio-Kontrolle unterscheidet, deren Titer sich in der Nähe der Wirkungs-
grenze befindet.

Die Wirksamkeit der verschiedenen, in den Experimenten erprobten D.-Hydro-
cortisondosen ist recht unterschiedlich. Während sich bei einer Dosis von
0,2 mg/ml D.-Hydrocortison noch keine Wirkung zeigt, und diese bei 0,5 mg/ml
gering ist, tritt bei einer Dosis von 1,0 mg/ml eine deutliche Beeinflussung
der Infektionsrate auf, die signifikant zu nennen ist. Bei einer Dosis von
2,0 mg/ml ergibt sich keine Steigerung in der Wirkung mehr, so dass unter
den gegebenen Versuchsbedingungen möglicherweise bereits das Wirkungs-
maximum erreicht ist.

Diese Ergebnisse haben natürlich wegen der sehr hohen wirksamen Dosen
keine klinische Bedeutung, an Hand dieser Versuche sollte nur prinzipiell ein-
mal die Wirkung von D.-Hydrocortison auf eine ablaufende immunologische
Reaktion geprüft werden.

Zur Diskussion steht 3. ein Einfluss von D.-Hydrocortison auf die Interferon-
bildung.

Nach den Arbeiten die sich mit diesem Problem befasst haben, ist ein Ein-
fluss der Nebennierenrindenhormone auf die Interferonbildung sehr wahrschein-
lich geworden. Der Einfluss von D.-Hydrocortison auf das Interferon wurde bisher
an Influenza-Viren (52, 55, 94) und am Sindbis-Virus (14) untersucht. Kilbourne,
Smart und Pokorny untersuchten den Einfluss von Nebennierenrindenhormonen
auf die Bildung und die Wirksamkeit des Interferon (55). Sie wiesen durch
Haemagglutinationsbestimmung eine deutlich verringerte Interferonbildung
nach Cortisongaben von 0,1-1,0 mg/ml nach. In zahlreichen Experimenten am
Brutei mit Influenzaviren, fand Kilbourne eine gesteigerte Virusausschüttung nach
längerer Cortisoneinwirkungsdauer und höherer Viruskonzentration (52). Er er-
klärt diese Befunde als eine Hemmung der Autointerferenz und nimmt eine ge-
hemmte Interferonbildung als Ursache an. Ebenso fanden de Maeyer E. und
de Maeyer J. in einer Arbeit über einen angeblichen doppelten Effekt des Corti-
sons auf das Interferon (bei Sindbis-Virus-Challenge), dass Dianabol und Corti-
sol in einer Dosis von 0,025 und 0,25 Gamma/ml bereits eine deutliche De-
pression des Interferontiters zur Folge hat (14). v. Wasielewski und Mitarbeiter
fanden bei experimentellen Studien zum Wesen des Cortisoneingriffes bei Virus-

infektion mit Influenzaviren zwar eine erhöhte Virusausschüttung nach Cortisongabe aber es ergab sich hier kein Einfluss des Hormones auf die Interferonbildung (94).

Vielleicht liegt die Ursache der verschiedenen Ergebnisse in den voneinander verschiedenen Versuchsanordnungen. So war der Zeitpunkt des Cortisonzusatzes von jedem Autor anders gewählt, daneben die Cortisolkonzentration und vor allem die Art und Dauer der Interferonbildung verschieden. Während sie bei Kilbourne, Smart und Pokorny sowie de Maeyer 70 Std. bzw. 3 Tage währte, wählten v. Wasielewski und Mitarbeiter eine Zeit von nur 2 Std.. Das Virus das zur Interferonbildung verwendet wurde, war bei Kilbourne, Smart und Pokorny, sowie bei de Maeyer E. und J. infektiös, während es bei v. Wasielewski inaktiv war.

In den eigenen Experimenten mit Polioviren wurde ein Interferon verwendet, das 3 Tage nach Beginn der Zellinfektion geerntet wurde (nach de Maeyer (14)). In einem Versuch wurde die Dauer der Interferoneinwirkung, die Zeit der Challenge-Infektion und die Zeit der Virusvermehrung variiert.

Zu diskutieren ist nun, ob in der verwendeten Versuchsanordnung die hemmende Wirkung des D.-Hydrocortison die Interferonbildung, oder mehr die Interferonwirkung auf der Zellkultur betrifft. 1. In Versuch 2-7 wurde nach Soerensen dialysiertes Interferon verwendet, durch das, wie de Maeyer gezeigt hat, auch das D.-Hydrocortison zu etwa 90% entfernt wird (14). Unter Berücksichtigung einer teilweise verwendeten Interferonverdünnung von 1:8, ergibt sich hier für das zurückgebliebene, wirksame Hormon eine Wirkungs-dosis von etwa 2 Gamma ml. Diese Dosis ist 80mal geringer als die auf die Interferonbildung wirkende Hydrocortisonkonzentration. 2. In Versuch 1 wurde nicht dialysiertes, unverdünntes Interferon verwendet, die Wirkungs-dosis von D.-Hydrocortison betrug hier also den 80fachen Wert wie in Versuch 2-7. Die D.-Hydrocortisonwirkung in Versuch 1 unterscheidet sich jedoch nicht wesentlich von der der übrigen Versuche. 3. In Versuch 1 betrug die Einwirkungs-dauer des Interferon B (Interferon + D.-Hydroc.) auf die Zellen 2 Std., in Versuch 2-7 dagegen 16 Std.. Der Effekt des Hormones aber ist hier wie dort etwa gleich. 4. De Maeyer fand, wenn er Cortisol in Gammakonz. zum Interferon zugeb und nach einer Inkubation von 12 Std., die Zellkulturen vor der Challenge-Infektion wusch, also die gleiche Versuchsanordnung wie wir wählte, keinen Hormoneinfluss auf die Interferonwirkung (14). Nach dem Gesagten ist also ein D.-Hydroc.-Einfluss auf die Interferonbildung als sehr viel wahrscheinlicher anzunehmen.

Würde das D.-Hydrocortison hemmend auf die Interferonbildung einwirken, so müssten sich die Befunde (siehe Tabellen und Fig. 3) aus der niedrigeren Interferonkonzentration und somit aus der relativ grösseren Polio-Konzentration und ihrer Wirkung auf die Zellkultur erklären. Wie sich aus Fig. 3 deutlich entnehmen lässt, ergibt sich auch bei Interferon B eine gegenüber Interferon A erniedrigte Infektionsrate und auf Grund der früher einsetzenden intrazellulären Virusvermehrung die Verschiebung im Grad der Fluoreszenz bei Stadium (++).

Wie könnte man sich nun die Wirkung des D.-Hydrocortison auf die interferonbildende Zelle vorstellen?

Beim Interferon handelt es sich um einen Stoff, den die Zelle wahrscheinlich nach dem Einwirken eines Virus bildet (38). Hierbei scheint einmal die Proteinsynthese der Zelle eine Rolle zu spielen. So konnte durch eine Behandlung der Interferon bildenden Zelle mit p-Fluorphenylalanin, von dem feststeht, dass es die Proteinsynthese hemmt, die Interferonbildung verhindert werden (38). Zum anderen ist es sehr wahrscheinlich, dass bei der Interferonbildung in der Zelle auch die DNS (70) und RNS (102) eine Bedeutung besitzt. Paucker und Henle zeigten, dass nur die Virus-DNS eine Interferenz auslösende Wirkung besitzt (70) und aus den Experimenten von Heller, Levy und Baron geht hervor, dass die Interferonproduktion unter der Kontrolle DNS-abhängiger RNS-Synthese steht (102).

Das Cortison besitzt, wie aus zahlreichen Experimenten hervorgeht, eine hemmende Wirkung auf den Eiweissstoffwechsel der Zelle (21, 26, 27, 36, 45, 67, 76, 96). In jüngster Zeit glaubt man auch eine hemmende Wirkung von Cortison auf die Enzyme des C₁-Stoffwechsels der Purinsynthese entdeckt zu haben (99). Es wäre also durchaus denkbar, dass das D.-Hydrocortison, sei es durch Hemmung der Proteinsynthese, sei es durch Hemmung der DNS oder RNS-Synthese die Interferonbildung beeinträchtigen könnte.

E. Zusammenfassung

In In-Vitro-Experimenten wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode der Einfluss von D.-Hydrocortison auf das Poliomyelitisvirus Typ I untersucht.

1. Ein Einfluss von D.-Hydrocortison auf die Virusadsorption und auf die intrazelluläre Virusvermehrung in einer Dosis von 0.1 und 0.2 mg/ml wurde nicht nachgewiesen.
2. In einer Untersuchung über den Einfluss des D.-Hydrocortison auf die ablaufende Neutralisationsreaktion von Humanantikörpern und Poliomyelitisvirus Typ I, konnte in Dosen von 1.0 mg und 2.0 mg/ml eine signifikante und konstante Erhöhung der Infektionsraten durch D.-Hydrocortison nachgewiesen werden. Unter D.-Hydrocortisoneinfluss konnte weiterhin eine beschleunigt ablaufende intrazelluläre Virusvermehrung gefunden werden. Der Mechanismus einer Beeinflussung der Antigen-Antikörper-Bindung durch das Hormon wurde diskutiert.
3. In Experimenten über die D.-Hydrocortisonwirkung auf die Interferonbildung durch das Poliomyelitisvirus Typ I, ergab sich bei einer Dosis von 0.2 mg/ml eine deutliche Hemmung des Interferon durch das Hormon. Als Wirkungsmechanismus wurde der hemmende Effekt von Cortison auf die Protein- und Nukleinsäuresynthese der Interferon bildenden Zelle diskutiert.

F. Literaturverzeichnis

- 1) Arpels C., Babcock V.J. und Southam C.M.: Effect of Steroids on Human Cell Cultures; Sustaining Effect of Hydrocortisone. *Proc.Soc.Exptl.Biol. u. Med.* 115, 102, 1964.
- 2) Bader I.P.: Production of Interferon by Chick Embryo Cells Exposed to Rous Sarcoma Virus. *Virology* 16, 436, 1962.
- 3) Bierich J.R.: Zur Klinik der ACTH und Cortisonbehandlung. *Monatsschrift für Kinderheilkunde* 108, 176, 1961.
- 4) Blumer H., Richter M., Cua-Lin F. und Rose B.: Precipitating and Non-precipitating Antibodies in the Primary and Secondary Immune Responses. Effect of Cortisone. *J.Immun.* 88, 669, 1962.
- 5) Burke D.C. und Isaacs A.: Some Factors Affecting the Production of Interferon. *British J.Exptl.Med.* 39, 452-458, 1958.
- 6) Cantell K.: Production and Action of Interferon in Hela Cells. *Archiv der gesamten Virusforschung* 10, 510, 1961.
- 7) Cantell K. und Paucker K.: Studies on Viral Interferon in Two Lines of Hela Cells. *Virology* 19, 81-87, 1963
- 8) Cantell K., Skurska Z., Paucker K. und Henle W.: Quantitative Studies on Viral Interference in Suspended L-Cells. II. Factors Affecting Interference by UV Irradiated Newcastle Disease Virus Against Vesicular Stomatitis Virus. *Virology* 17, 312, 1962.
- 9) Chadwick C.S. und Nairn R.C.: Fluorescent Protein Tracers: The unreacted Fluorescent Material in Fluorescein Conjugates and Studies of Conjugates with Other Green Fluorochromes. *Immunology* 3, 363-370, 1960.
- 10) Cherry W.B., Goldman M. und Carski T.R.: Fluorescent Antibody Techniques in the Diagnosis of Communicable Diseases. U.S. Department of Health, Education, and Welfare. Public Health Service, Atlanta, Georgia, 1960.
- 11) Coons A.H., Creeck H.J. und Jones R.N.: Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Proc.Soc.Exp.Biol. u. Med.* 47, 200-202, 1941.
- 12) Coons A.H. und Kaplan M.H.: Localization of Antigen in Tissue Cells. II. Improvements in a Method for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent Antibody. *J.Exper.Med.* 91, 1-13, 1950.
- 13) Darnell J.E. jr. und Sawyer T.K.: The Basis for Variation in Susceptibility to Poliovirus in Hela Cells. *Virology* 11, 665, 1960.

- 14) De Maeyer E. und de Maeyer J.: Twosides Effect of Steroids on Interferon in Tissue Culture. *Nature* 197, 724-725, 1963.
- 15) De Sommer P., Prinzie A. und Denys P. jr., Schonke E.: Mechanism of Action of Interferon. I. Relationship with Viral Ribonucleic Acid. *Virology* 16, 63-70, 1962.
- 16) Dransfeld B.: Zweiterkrankungen an Varicellen unter Cortison und Prednison. *Arch.f.Kinderkr.* 158, 170, 1958.
- 17) Dulbecco R., Vogt M. und Strickland A.G.R.: A Study of the Basic Aspects of Neutralization of Two Animal Viruses, Western Equine Encephalitis Virus and Poliomyelitis Virus. *Virology* 2, 162-205, 1956.
- 18) Dux E., Pinter G., Bakacsi G. und Pintér A.: Beobachtungen über das Auftreten von Viruserkrankungen bei mit Corticosteroiden behandelten Kranken. *Kinderärztl.Praxis* 30, 495-501, 1962.
- 19) Erichsen S.: The Inhibition of the Proliferation of Cowpox Virus in Embryonated Hen's Eggs by Cortisone. I. Study by Measurement of the Thickness of the Proliferated Ectoderm in Infected Chorioallantois Membranes. *Acta Endocrinologica* 43, 439-446, 1963.
- 20) Erichsen S.: The Inhibition of the Proliferation of Cowpox Virus in Embryonated Hen's Eggs by Cortisone. II. Titration of Pock Forming Units in Infected Chorioallantoic Membranes. *Acta Endocrinologica* 43, 447-457, 1963.
- 21) Fisher T.N. und Fisher E. jr.: Effects of Cortisone and Herpes simplex Virus on Metabolic Processes. I. Alterations in Hela Cell Metabolism. *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 100, 780, 1959.
- 22) Foster C., Sigel M.M. und Henle W.: The Influence of ACTH on the Resistance of Monkeys to the Yale SK Strain of Poliomyelitis Virus. *The J.Lab.Clin.Med.* 38, 359-362, 1951.
- 23) Geiger R.S., Dingwell J.A. und Andrus W. de W.: The Effect of Cortisone on the Growth of Adult and Embryonic Tissues in Vitro. *Am.J.Med.Sc.* 231, 427, 1956.
- 24) Githin D., Landing B.H. und Whipple A.: The Localization of Homologous Plasma Proteins in Tissues of Young Human Beings and Demonstrated with Fluoreszent Antibodies. *J.Exper.Med.* 97, 163, 1953.
- 25) Griffin, Carski T.R. und Warner: Labeling Procedures Employing Crystalline Fluoreszein-Isothiocyanate. *J.Bact.* 82, 534-537, 1961.
- 26) Grossfeld H.: Action of Hydrocortisone on Respiration and Aerobic Glykolysis of Cultured Cells. *Science* 127, 148, 1958.

- 27) Grossfeld H. und Ragan C.: Action of Hydrocortisone on Cells in Tissue Culture. *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 86, 63, 1954.
- 28) Grossberg E.S. und Holland J.J.: Interferon and Viral Ribonucleic Acid. Effect of Virus - Susceptible and Insusceptible Cells. *J.Immunology* 88, 708, 1962.
- 29) Haggerty R.J. und Eley R.C.: Varicella and Cortisone. *Pediatrics* 18, 160-162, 1952.
- 30) Hatch M.H., Kalter S.S. und Ajello W.G.: Identification of Poliovirus Isolates with Fluorescent Antibody. *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 107, 1-4, 1961.
- 31) Henle W.: Interference between Animal Viruses: A Review. *J.Immun.* 64, 203, 1950.
- 32) Henle W.: Interference and Interferon in Persistent Viral Infections of Cell Cultures. *J.Immunology* 91, 145, 1963.
- 33) Hinuma Y. und Hummeler K.: Studies on the Complement-Fixing Antigens of Poliomyelitis. III. Intracellular Development of Antigen. *J.Immun.* 87, Nr. 4, 1961.
- 34) Ho M.: Effect of Interferon on Viral Ribonucleic Acid and Plaque Formation. *Proc.Soc.Exp.Biol. u. Med.* 112, 512 (1963).
- 35) Ho M. und Enders J.F.: An Inhibitor of Viral Activity Appearing in Infected Cell Cultures. *Proc.Nat.Acad.Sc.* 45, 385, 1959.
- 36) Holden M. und Adams L.B.: Inhibitory Effects of Cortisone Acetate and Hydrocortisone on Growth of Fibroblasts. *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 95, 364, 1957.
- 37) Hummeler K. und Hamparian V.: Studies on the Complement Fixing Antigens of Poliomyelitis. I. Demonstration of Type and Group Specific Antigens in Native and Heated Viral Preparations. *J.Immunology* 81, Nr. 6, 1958.
- 38) Isaacs A.: Interferon. *Advances in Virus. Res.* 10, 1-35, 1963.
- 39) Isaacs A. und Burke D.C.: Mode of Action of Interferon. *Nature* 182, 1073-1074, 1958.
- 40) Isaacs A. und Klemperer H.G., Hitchcock G.: Studies on the Mechanism of Action of Interferon. *Virology* 13, 191, 1961.
- 41) Isaacs A. und Lindenmann J.: Virus Interferon. I. The Interferon. *Proc.Roy. Soc.* 147, 258, 1957.
- 42) Isaacs A. und Lindenmann J.: Virus Interference. II. Some Properties of Interferon. *Proc.Roy.Soc.* 147, 268, 1957.

- 43) Jochim J.: Bösartiger Verlauf der Varicellen infolge einer Cortisonbehandlung. Med.Klin. 55, 1208, 1960.
- 44) Kass E.H. und Finland M.: Adrenocortical Hormones in Infection and Immunity. Ann.Rev.Microb. 7, 361, 1953.
- 45) Kass E.H. und Hendrick M.J.: Effect of Cortisone on Nucleoproteins of Lymphnodes. Fed.Proc. 11, 472-473, 1952.
- 46) Kass E.H., Lundgren M.M. und Finland M.: The Effect of Adrenal Steroids, Corticotropin and Growth Hormon in Resistance to Experimental Infections. J.Exp.Med. 99, 89, 1954.
- 47) Kilbourne E.D.: Paradoxial Effects of Cortisone on Influenza B-Virus Infection of the Chick Embryo. Fed.Proc. 9, 290, 1950.
- 48) Kilbourne E.D.: The Influence of Cortisone on Experimental Viral Infection. I. Prolongation of Survival Time and Suppression of Inflammation in Chick Embryos Infected with Influenza-B-Virus. J.Immunology 74, 57, 1955.
- 49) Kilbourne E.D.: Reactivation of Non Infective Virus in a Cortisone Injected Host. J.Exper.Med. 101, 437, 1955.
- 50) Kilbourne E.D.: Cortisone Modification of the Dynamics of Influenza Virus Increase. Fed.Proc. 15, 597 (1956).
- 51) Kilbourne E.D.: The Influence of Cortisone on Experimental Viral Infection. III. Effects on Certain Dynamics of Influenza Virus Increase. J.Exptl.Med. 106, 851-862, 1957.
- 52) Kilbourne E.D.: The Influence of Cortisone on Experimental Viral Infection. IV. Negation of Interference as the Mechanism by which Cortisone Induces Increase Virus Yields. J.Exper.Med. 106, 863-881, 1957.
- 53) Kilbourne E.D. und Horsfall F.L. jr.: Lethal Infection with Cocksackie Virus of Adult Mice Given Cortisone. Proc.Soc.Exp.Biol. u. Med. 77, 135, 1951.
- 54) Kilbourne E.D. und Horsfall F.L. jr.: Increased Virus in Eggs Injected with Cortisone. Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med. 76, 116, 1951.
- 55) Kilbourne E.D., Smart K.M. und Pokorny B.A.: Inhibition by Cortisone of the Synthesis and Action of Interferon. Nature 190, 650-651, 1961.
- 56) Kline J., Leighton J., Belkin M. und Orr H.C.: Some Observations on the Response of Four Established Human Cell Strainsto Hydrocortisone in Tissue Culture. Cancer Research 17, 780, 1957.
- 57) Klöne W.: Untersuchungen über den zeitlichen Ablauf der Infektion und des Ausbreitungsmechanismus des Poliomyelitisvirus in Gewebekulturen. Zentralbl. Bakt. I Orig. 162, 431, 1955.
- 58) Lampson G.P., Tytell A.A., Nemes M.M. und Hillemann M.R.: Purification and Characterisation of Chick Embryo Interferon. Proc.Soc.Exp.Biol. u. Med. 112, 468, 1963.

- 59) Lenti G., Tortarolo E., Musolino G. und Tappero T.: Azione Dell' Idrocortisone Su Elementi Coltivati in Vitro. *Folia Endocrinologica* 9 (6), 741-748, 1956.
- 60) Lindenmann J., Burke D.C. und Isaacs A.: Studies on the Production, Mode of Action and Properties of Interferon. *Brit.J.Exper.Med.* 38, 551-552, 1957.
- 61) Luria S.E., Delbruck M.: Interference Between Inactive Bacterial Virus and Active Virus of the Same Strain and of Different Strain. *Arch.Bioch.* 1, 207, 1942.
- 62) Mandel B.: Studies on the Interactions of Poliomyelitis Virus, Antibody and Host Cells in a Tissue Culture System. *Virology* 6, 424-447, 1958.
- 63) Mandel B.: Reversibility of the Reaction between Poliomyelitis-Virus and Neutralizing Antibody of Rabbit Origin. *Virology* 14, 316-328, 1961.
- 64) Mayer V., Sokol F. und Vilček J.: Infection of Interferon-Treated Cells with Eastern Equine Encephalomyelitis Virus and Its Ribonucleic Acid. *Virology* 16, 351, 1962.
- 65) Munyon W.: Inhibition of Poliovirus by 2,6-Diaminopurine. *Virology* 22, 15, 1964.
- 66) Nichols W.W.: Experience with Chickenpox in Patients with Haematologic Disease Receiving Cortisone. *Am.J.Dis.Child.* 94, 219, 1957.
- 67) Nowell P.C.: Inhibition of Human Leukocyte Mitosis by Prednisolon in Vitro. *Cancer Research* 21, 1518, 1961.
- 68) Paucker K. und Cantell K.: Neutralization of Interferon by Specific Antibody. *Virology* 18, 145, 1962.
- 69) Paucker K., Cantell K. und Henle W.: Quantitative Studies on Viral Interference in Suspended L-Cells. III. Effect of Interfering Viruses and Interferon on the Growth Rate of Cells. *Virology* 17, 324-334, 1962.
- 70) Paucker K. und Henle W.: Interference between Inactivated and Active Influenza Viruses in Chick Embryo. II. Interference by Incomplete Forms of Influenza Virus.
- 71) Paucker K., Skurska Z. und Henle W.: Quantitative Studies on Viral Interference in Suspended L-Cells. I. Growth Characteristics and Interfering Activities of Vesicular Stomatitis, Newcastle Disease and Influenza-A Virus. *Virology* 17, 301, 1962.
- 72) Pereira H.G.: A Virus Inhibitor Produced in Hela Cells Infected with Adenovirus. *Virology* 11, 590, 1960.

- 73) Polikoff R., Donikian M.A., Padron A. und Liu O.C.: Tissue Specificity of Interferon Prepared in Various Tissue Cultures. *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 110, 232-234, 1962.
- 74) Porath J. und Flodin P.: Gelfiltration: A Method for Desalting and Group Separation. *Nature* 183, 1657, 1959.
- 75) Riggs J.L. und Brown G.C.: Differentiation of Active and Passive Poliomyelitis Antibodies in Human Sera with Indirect Immunofluoreszenz. *J.Immunology* 89, 868-874, 1962.
- 76) Rivera E.M., Elias J.J., Bern H.A., Napackov N.P. und Pitelka D.R.: Toxic Effects of Steroid Hormones on Organ Cultures of Mouse Mammary Tumors, with a Comment of Viral Inclusion Bodies. *J.Nat.Cancer Inst.* 31, 671, 1963.
- 77) Robertson H.E., Brunner K.T. und Syverton J.T.: The Propagation in Vitro of Poliomyelitis Viruses. VII. PH-Change of Hela Cell Cultures for Assay. *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 88, 119, 1955.
- 78) Roizman B., Höpken W. und Mayer M.M.: Immunochemical Studies of Poliomyelitis. II. Kinetics of the Formation of Infectious and Noninfectious Typ I Poliomyelitisvirus in Three Cell Strains of Human Derivation. *The J.Immunology* 80, 386, 1958.
- 79) Ruiz-Gomez J. und Isaacs A.: Interferon Production by Different Viruses. *Virology* 19, 8-12, 1963.
- 80) Sabin A.B. und Fieldsteel A.H.: Effect of Certain Hormones and Other Chemical Compounds on Experimental Poliomyelitis. *Am.J.Dis.Child.* 84, 464-465, 1952.
- 81) Scheiffarth F.H., Schuler E. und Berg G.: Untersuchungen über die Beeinflussung der Serumprotein und Antikörper Produktion durch ACTH und Cortison. *Dtsch.Med.Wschr.* 1113, 1956.
- 82) Shee J.C. und Fehrsen P.: Reactivation of Varicella by Cortisone Therapy. *Brit.Med.J.* 53 11, 82, 1953.
- 83) Shwartzman G.: Poliomyelitis Infection in Cortisone Treated Hamsters Induced by the Intraperitoneal Route. *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 79, 573, 1952.
- 84) Shwartzman G.: Enhancing Effect of Cortisone Upon Poliomyelitis Infection (Strain MEFJ) in Hamsters and Mice. *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 75, 835-838, 1950.

- 85) Smith J.Mc.L., Murphy J.S., Mirick G.S. und Huch M.E.: Effect of Adrenal Hormones on Infection of Mice with Pneumonia Virus of Mice (PVM). *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 78, 505, 1951.
- 86) Southam C.M. und Babcock V.J.: Effect of Cortisone Related Hormones and Adrenalectomy on Susceptibility of Mice to Virus Infect. *Proc.Soc. Exper.Biol. u. Med.* 78, 105, 1951.
- 87) Sreevalsan T. und Lockart R.Z. jr.: A Comparison of Methods for Interferon Assay. *Virology* 17, 207, 1962
- 88) Starr T.J. und Pollard M.: Susceptibility of Cortisone Treated Mice to Infection with Mouse Hepatitis Virus. *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 99, 108, 1958.
- 89) Thomssen R., Haas R., Dostal V. und Ruschmann E.: Über den Einfluss des Beimpfungsvolumen auf die Adsorption von Poliomyelitisvirus an Gewebekulturen. *Zeitschr.Hyg.* 146, 114-122, 1959.
- 90) Tokumaru T.: A Kinetic Study of the Labeling of Serum Globulin with Fluoreszein Isothiocyanate by Means of the Gel Filtration Technique. *The J.Immunology* 89, Nr. 2, 195, 1962.
- 91) Tyrell D.A.J., Tamm I.: Prevention of Virus Interference by 2,5-Di-aethylbenzimidazol. *J.Immun.* 75, 43, 1955.
- 92) Wagner R.R.: Viral Interference. Some Considerations of Basic Mechanisms and Their Potential Relationship to Host Resistance. *Bact.Revs.* 24, 151-166, 1960.
- 93) Ward P.A. und Johnson A.G.: Studies on the Adjuvant Action of Bacterium Endotoxins of Antibody Formation. II. Antibody Formation in Cortisone Treated Rabbits. *The J.Immunology* 82, 428, 1959.
- 94) v.Wasielewski E.V., Thiele G. und Stauter H.: Experimentelle Studien zum Wesen des Cortisoneingriffes bei Virusinfektionen, unter besonderer Berücksichtigung von Interferenzmechanismen. *Z.Hyg.Inf.Kr.* 147, 504-520, 1961.
- 95) Weller T.H. und Coons A.H.: Fluoreszent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated in Vitro. *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 86, 789-794, 1954.
- 96) Wellington J.S. und Moon H.D.: Effekt of Hydrocortisone on Human Cells in Tissue Culture. *Proc.Soc.Exper.Biol. u. Med.* 107, 556, 1961.
- 97) Wheeler C.E., Harvie E.J. und Canby C.M.: The Effect of Hydrocortisone on the Production of Herpes Simplex Virus in Tissue Culture. *J.Invest Derm.* 36, 89, 1961.

- 98) Wheelock E.F. und Tamm J.: Enumeration of Cell-Infecting Particles of Newcastle Disease Virus by the Fluoreszent Antibody Technique. J.Exptl.Med. 113, 301, 1961.
- 99) Willmanns W. (Tübingen) auf der 69. Tagung der Dt.Gesellschaft für Innere Medizin in Wiesbaden vom 22.-25. April 1963.
- 100) Wormal A. und Hopkins S.J.: Phenyl-Isocyanate Protein Compounds and Their Immunological Reactions. J.Biochem. 27, 740-753, 1933.
- 101) Zimmermann W., Brühl P.: Die Rolle der Steroidhormone im Infektionsablauf. Zeitschr.f.Hyg. 149, 194-205, 1963.
- 102) Nachtrag: Levy, Baron (unveröffentlicht) zit. nach Isaac A.: Interferon. Adv.Vir.Res. 10, 31, 1963.

Lebenslauf

Als Sohn des Amtsarztes Dr.med. Luitpold W. Bornschein und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Westinger, wurde ich am 19. Dezember 1939 in München geboren. Ich besuchte in München-Trudering und Bernau am Chiemsee fünf Jahre lang die Volksschule. Im Sommer 1950 bestand ich die Aufnahmeprüfung in das Staatliche Landschulheim Marquartstein mit Oberrealschule und legte dort 1959 die Reifeprüfung ab. Im November 1959 begann ich mein Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Ich legte dort nach dem 2. Semester im Herbst 1960 das Vorphysikum ab und bestand im Frühjahr 1962 die ärztliche Vorprüfung. Das medizinische Staatsexamen beendete ich am 10. Juni 1965.

